

На правах рукописи

МЕЛКОНЯН КАРИНА ИГОРЕВНА

**РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ БИОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ
НА ОСНОВЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЕРМЫ
В КАЧЕСТВЕ ТКАНЕЗАМЕЩАЮЩИХ И АКТИВИРУЮЩИХ
РЕПАРАЦИЮ СРЕДСТВ**

3.3.3. Патологическая физиология

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

Краснодар – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор
Быков Илья Михайлович.

Официальные оппоненты:

Власов Тимур Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патофизиологии с курсом клинической патофизиологии Научно-образовательного института биомедицины, заведующий кафедрой;

Рогова Людмила Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патофизиологии, клинической патофизиологии, профессор кафедры;

Вавилова Татьяна Павловна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биологической химии стоматологического факультета, профессор кафедры.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

Защита состоится 17 сентября 2024 года в 09.00 час. на заседании диссертационного совета 21.2.014.02 на базе ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (350063, г. Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4, тел. (861) 2625018).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте (<http://www.kスマ.ru>) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан «___»_____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 21.2.014.02
доктор медицинских наук,
профессор



Лапина Наталья Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В последнее время в клинических ситуациях, характеризующихся выраженным тканевым дефицитом, всё большую значимость приобретают материалы на основе биополимеров – природных биомолекул, синтезируемых микроорганизмами, растениями и животными и обладающих оптимальной биосовместимостью. В частности, весьма актуальна разработка различных каркасов на основе биоактивных полимеров, которые не только обладают барьерными свойствами, но и положительно действуют на обмен веществ, ускоряя процессы репарационной регенерации (М. Ishii, 2017; О.В. Владимирова и соавт., 2021; T.G. Sahana et al., 2018). Проллиферативные, ангиогенные антибактериальные и иммуномодулирующие свойства биополимеров создают микросреду, благоприятную для процесса заживления (Т.И. Салихова и соавт., 2017). На данный момент для восполнения тканевых дефектов используются биополимерные материалы на основе целлюлозы, альгинатов, гиалуроновой кислоты, коллагена и хитозана (T.G. Sahana et al., 2018; М.Г. Дроздова и соавт., 2016). Коллаген является одним из наиболее перспективных биоматериалов, широко применяемых в мировой медицинской практике, коллагенсодержащие препараты используются в различных областях медицины как самостоятельный фактор стимуляции регенерации тканей. Недостатком применения данных биоматериалов является отсутствие необходимого комплексного воздействия для восстановления полноценных обменных процессов, а также относительно высокие сроки биodeградации. При этом, становится очевидно, что монокомпонентные и синтетические материалы, в связи с ограниченным естественным потенциалом поврежденных тканей к восстановлению, не смогут обеспечить необходимую степень терапевтической эффективности без наличия в своем составе биологически активных компонентов, способных оптимизировать и/или индуцировать репаративный гистогенез. Потенциальным источником природоподобного комплекса биополимеров, сходного с нативным дермальным матриксом, являются децеллюляризованные соединительнотканые каркасы кожи и дермы. Децеллюляризация нативных органов и тканей способствует сохранению биохимического состава, тканевой структуры, а также механических свойств сохранившегося внеклеточного матрикса на оптимальном уровне, а также обеспечивает отсутствие иммуногенности. Кроме того, в последние годы было показано, что компоненты дермального матрикса играют ключевую роль в контроле таких особенностей клеточной физиологии как пролиферативная активность, способность к дифференцировке и миграции, потентность (стволовость) и уровень метаболизма (J. Cheng et al., 2019). Внеклеточный матрикс (ВКМ) дермы, полученный после децеллюляризации, может обеспечивать сигналы для адгезии, сайты связывания для факторов роста и ферментов, деградирующих ВКМ при миграции клеток. Немаловажную роль в деградации коллагена и ремоделировании ВКМ принимают матриксные металлопротеиназы, обуславливающие также миграцию кератиноцитов, агрегацию тромбоцитов и пролиферацию клеток (S.T. Diniz-Fernandes et al., 2018; Л.Н. Рогова и соавт., 2018). Понимание механизмов, лежащих в основе данных функций важно для получения материалов, которые могут имитировать молекулы биологического распознавания, способные контролировать взаимоотношения между клетками и их есте-

ственным микроокружением, а также для разработки терапевтических подходов, позволяющих усилить репарацию при повреждении тканей.

Таким образом, разработка биопластических материалов на основе ВКМ дермы в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств и внедрение в клинику новых медицинских технологий с использованием данных средств является актуальной для фундаментальной медицины и практического здравоохранения.

Степень разработанности темы исследования. Использование различных подходов регенеративной терапии является одним из наиболее перспективных методологических подходов для активации репарации и ремоделирования тканей (T.G. Sahana et al., 2018; К.В. Дергилев и соавт., 2016). Для лечения острых травм и хронических заболеваний, поражающих мышцы, кости, мягкие ткани используют локальное инъекционное введение аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы, фибриновые гели, матриксы и др. (Д.А. Маланин и соавт., 2020; Е.А. Епифанов и соавт., 2021). В целях создания оптимальных условий для регенерации и предотвращения чрезмерных потерь биологически важных для организма жидкостей и веществ при лечении ожоговых ран исследуются различные временные раневые покрытия (эквиваленты кожи, алло- и ксенотрансплантаты), являющиеся одними из последних достижений в области молекулярной и клеточной биологии (А.А. Алексеев и соавт., 2021; Л.И. Будкевич и соавт., 2018). Одним из таких материалов является биологическое покрытие на основе нереконструированного коллагена I типа «Коллост». Это стерильный биопластический материал с полностью сохраненной нативной структурой коллагена, полученный из кожи крупного рогатого скота, который является матрицей для направленной тканевой регенерации (В.Н. Оболенский, 2016; Л.И. Будкевич и соавт., 2018). При получении отечественного биологического покрытия «Ксенодерм» (ЗАО «АБ Медикал») свиную кожу обрабатывают лиофильным способом путем замораживания и высушивания в вакууме, что не лишает её ксеногенных компонентов. На сегодняшний день имеется несколько хирургических материалов на основе биополимеров, используемых для реконструкции мягких тканей – AlloDermTM, StratticeTM, DermaMatrixTM, SurgiMend[®], PermacolTM, Veritas[®], FlexHD[®]. Однако не все они могут применяться в отечественной хирургии в связи с законодательством (AlloDermTM, DermaMatrixTM, DermalogenTM, Cymetra[®]), а материалы из бычьего коллагена могут вызывать сильную аллергическую реакцию и являться источником трансмиссивной губчатой энцефалопатии (прионной болезни) (А.В. Shekhter et al., 2019; N. Smart et al., 2012). Наиболее многообещающими в данном направлении являются матриксы на основе дермы свиньи (EvolenceTM, StratticeTM, FibroquelTM, PermacolTM), использование которых резко снижает риск аллергических осложнений (P. Lucey et al., 2014). Более того, использование дермы свиньи, которую можно получать из продуктов вторичного сырья, увеличивает производительность методики получения материалов. Тем не менее, данные хирургические материалы имеют крайне высокую стоимость, что ставит перед современной регенеративной медициной задачу по созданию более экономичного аналога. Также разработаны и изучены комплексные гидрогели для регенерации кожи и для применения в биомедицинских исследованиях, например, в биопринтинге и при культивировании клеточных культур (J. Xu et al., 2017; S. Ji et al., 2017; S. Mitura et al., 2020; Е.Е. Beketov et al., 2021). Перспективным материалом для создания

таких биополимерных гидрогелей является ВКМ тканей, состоящий из коллагенов, эластина, гликозаминогликанов и других биологически активных молекул (J.C. Rodríguez-Cabello et al., 2018; И.С. Кудряшова и соавт., 2021; J. Halper et al., 2014). Источником ВКМ в большинстве случаев являются ткани животных, в частности, дерма свиней и крупного рогатого скота (R.D. Ventura et al., 2020). В связи с этим в последнее время наблюдается повышенный интерес к разработке оптимального метода получения гидрогелей на основе ВКМ тканей животных.

Однако репаративный и метаболический потенциал коллагенсодержащих материалов изучен не полностью, а имеющиеся на данный момент результаты исследований в этой области противоречивы и недостаточны для понимания тех процессов, которые лежат в основе особенностей действия биопластических материалов на основе ВКМ дермы.

Цель исследования: разработка фундаментальных принципов создания биопластических материалов на основе внеклеточного матрикса дермы и экспериментальное обоснование их применения в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств.

Задачи исследования:

1. Разработать методику детергентно-энзиматической обработки ксеногенной дермы для получения биопластического материала с сохранением внеклеточного матрикса.

2. Провести комплексную оценку полученного биопластического материала – ацеллюлярного дермального матрикса (АДМ), включающую биохимический анализ на содержание сульфатированных гликозаминогликанов, гиалуроновой кислоты для оценки сохранности небелковых компонентов ВКМ, а также определить его биологические и биомеханические характеристики.

3. Разработать способ моделирования ожоговой раны на крупном лабораторном животном для оценки эффективности полученного биопластического материала.

4. Изучить эффективность применения АДМ в качестве раневого покрытия на модели острой ожоговой раны крупных лабораторных животных по динамике репаративных изменений в коже.

5. Выявить особенности биоинтеграции, а также оценить эффективность применения АДМ в качестве импланта при реконструктивной хирургии на модели крупных лабораторных животных.

6. Разработать методику химической обработки дермы для получения дермального гидрогеля – гидрогелевого материала на основе гидролизованного коллагена ВКМ дермы.

7. Провести комплексную оценку дермального гидрогеля: определение биохимического состава; анализ цитотоксичности, местной токсичности; адгезионная способность клеток при инкубации на разработанном материале *in vitro*.

8. Провести сравнительную оценку эффективности репаративных процессов и восстановления ВКМ кожи при применении дермального гидрогеля на модели ожоговой раны мелких лабораторных животных.

9. Изучить защитно-приспособительные процессы на модели ожоговой раны крыс при применении дермального гидрогеля по закономерностям изменения иммунологических параметров в сыворотке крови.

Научная новизна исследования. Впервые:

Разработана технология забора дермы свиньи в лабораторных условиях с помощью электродерматома, позволяющая целенаправленно получать лоскуты с заданными размерами.

Впервые предложена методика детергентно-энзиматической обработки дермы, позволяющая расширить возможности обработки сырья с различной массой с максимальным сохранением гистологической структуры дермы без использования сшивающих токсических агентов.

На основании проведенного комплексного исследования биопластических материалов доказана их биосовместимость и возможность применения в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств.

Разработан способ моделирования ожоговой раны на крупном лабораторном животном (свинья), что позволяет проводить анализ приживления раневых покрытий как при раннем, так и при этапном хирургическом лечении ожогов.

Созданы оригинальные биорезорбируемые биопластические материалы, не содержащие синтетических сшивающих агентов, которые могут служить прототипами для последующей разработки медицинских изделий – раневых покрытий и хирургических имплантов.

Оптимизирована методика щелочного гидролиза дермы, позволившая получить гидрогелевый материал – дермальный гидрогель, обладающий биосовместимостью и отсутствием цитотоксичности.

Результаты исследования позволили получить новые данные о механизмах регенерации кожи в ответ на воздействие гидрогелевого материала на основе гидролизованного коллагена ВКМ дермы на пораженные участки кожи: ранняя эпителизация, накопление цитокератина, снижение темпов ресинтеза коллагена I типа; отсутствие динамики уровней коллагена IV типа и фибронектина.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные о механизмах регенерации кожи и о патогенетической природе возникающих в тканях на стадии ремоделирования в ответ на воздействие компонентов ВКМ дермы могут послужить фундаментальной основой для разработки новых подходов в регенеративной медицине. Разработанные материалы могут быть использованы лабораториями научно-исследовательских институтов в сфере здравоохранения или биологического профиля, специализирующихся на клеточной или тканевой инженерии и культивировании культур клеток для регуляции клеточной адгезии, дифференцировки, пролиферации и миграции клеток. Полученные данные могут быть использованы в разработке протоколов по применению биопластических материалов в комбустиологии (раневые покрытия, композиционные повязки на основе биополимерного геля, стимулирующие регенерацию кожи, что будет препятствовать дополнительному травмированию пациентов по сравнению с аутопластикой), дерматологии, реконструктивной хирургии (применение АДМ в качестве хирургических имплантов для маммопластики и герниопластики) и регенеративной медицины (терапия трофических язв, создание искусственных эквивалентов кожи. Анализ полученных данных может быть использован для разработки альтернативных подходов к терапии травматических повреждений кожных покровов, в ряде случаев поможет отказаться от оперативного вмешательства по восстановлению поврежденных тканей, что имеет большое значение в медицинской

практике, а также может способствовать научно обоснованному поиску и рациональному отбору новых средств для решения проблем реконструктивной пластической хирургии, в частности маммопластики и герниопластики.

Методология и методы исследования.

В ходе выполнения диссертационной работы использован комплекс биохимических, иммунологических (иммуноферментный анализ, иммуногистохимический анализ), гистологических и микроскопических методов исследования:

1. Детергентно-энзиматическое и детергентное воздействие на дерму свиньи методом децеллюляризации.

2. Биохимические исследования: выделение биополимеров ВКМ дермы свиньи, определение остаточной ДНК, общего белка, коллагена I типа, сульфатированных гликозаминогликанов (с-ГАГ), гиалуроновой кислоты.

3. Биофизические исследования: определение механической прочности, растяжимости.

4. Патолофизиологические методы: моделирование ожоговых ран IIIБ и IV степени на крупных и мелких лабораторных животных.

5. Определение коллагена I, IV типов, фибронектина, цитокератина, виментина – компонентов ВКМ; CD31, CD3, CD16b, CD68 – маркеров воспалительного процесса методом иммуногистохимического анализа.

6. Определение неспецифических системных маркеров воспаления (IL1 α , IL4, IL6, IL8, IL10) и репарации (IGF1, TGF β 1, TNF α , PDGF, VEGF) методом ИФА.

7. Гистологический анализ: рутинная окраска гематоксилин-эозином, окраска по Массону.

8. Исследование биосовместимости и биodeградации биополимерных матриц *in vivo* (подкожная имплантация, общая цитотоксичность, местная токсичность).

9. Клеточные культуральные работы: исследование адгезии, пролиферации и дифференцировки дермальных фибробластов; фенотипирование культуры фибробластов, определение их жизнеспособности и степени пролиферации.

10. Статистическая обработка данных проводилась с использованием методов описательной статистики, данные представляли в виде средних и распределения ($M \pm SD$) или медианы с первым и третьим квартилем ($Me [Q_1; Q_3]$). Достоверность различий между показателями оценивали в зависимости от характера распределения данных в выборках, с помощью стандартных критериев значимости: χ^2 Пирсона, F-критерия Фишера, для сравнения независимых групп использовали критерий Манна-Уитни, для зависимых групп – критерий Вилкоксона. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработанная методика детергентно-энзиматической обработки дермы свиньи позволяет получить тканезамещающий материал – ацеллюлярный дермальный матрикс с сохранением компонентов внеклеточного матрикса.

2. Биологические эффекты использования ацеллюлярного дермального матрикса в качестве раневого покрытия с метаболической, патохимической и функциональной сторон определяют оптимизацию процессов эпителизации, коллагеногенеза и ангиогенеза ожоговой раны.

3. Применение ацеллюлярного дермального матрикса эффективно при экспериментальной восстановительной пластике за счет способности к морфо-функциональной интеграции в ткани.

4. Гидрогелевый материал на основе гидролизованного коллагена ВКМ дермы позволяет создать условия для регенерации ожоговой раны, а именно способствует ранней эпителизации, накоплению цитокератина и ресинтезу коллагена, мобилизации защитно-приспособительных реакций за счет вовлечения медиаторов воспаления и иммуномодуляции.

Степень достоверности и апробации результатов. Диссертационная работа выполнена с применением современных высокотехнологичных методов научного исследования, статистическая обработка данных проведена с помощью программного решения GraphPadPrism (GraphPad Software Inc, США) и пакета программ Microsoft Office (Microsoft, США), что обеспечило обоснованность и достоверность результатов работы, выводов и рекомендаций.

Основные результаты исследований представлены на 24-ой международной Пуцинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (5–9 октября 2020 г., Пущино), VIII Международной научной Интернет-конференции: «Физико-химическая биология» (25–27 ноября 2020 г., Ставрополь), TERMIS EU (26–29 мая 2020 г., Манчестер), 2nd UK-Russia Young Medics Conference (6–7 января 2020 г., Кембридж), XVII научно-практической межрегиональной заочной конференции «Биомедицина и биомоделирование» (26–27 мая 2021 г., Москва), III Всероссийской научно-технической конференции «Состояние и перспективы развития современной науки по направлению «Биотехнические системы и технологии» (27–28 мая 2021 г., Анапа), Краевой отчетной конференции грантодержателей Кубанского научного фонда (24–25 июня 2021 г., Сочи), VII Съезде биохимиков России, X российском симпозиуме «Белки и пептиды», VII съезде физиологов СНГ (3–8 октября 2021 г., Сочи), 6th International World Congress THERMIS (15–19 ноября 2021 г., Маастрихт), научно-практической конференции с международным участием «БИОХИМИЯ XXI ВЕКА» (26 ноября 2021 г., Краснодар), международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию Белорусского государственного медицинского университета (13–17 декабря 2021 г., Минск), III Международной конференции «Время научного прогресса» (01 февраля 2022 г., Волгоград), 25-ой Пуцинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (18–22 апреля 2022 г., Пущино), 1-ом круглом столе «Новые полимерные и композиционные материалы: наука и бизнес» (29 июня – 02 июля 2022 г., Калининград), Краевой отчетной конференции грантодержателей Кубанского научного фонда (20–22 июня 2022 г., Сочи), IX Всероссийской научной молодежной школе-конференции «Химия, физика, биология: пути интеграции» (20–22 апреля 2022 г., Москва), V Национальном конгрессе по регенеративной медицине (23–25 ноября 2022 г., Москва), 26-ой международной Пуцинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (9–13 апреля 2023 г., Пущино).

Публикации по теме диссертации. Всего по материалам диссертации опубликовано 57 работ, в том числе 33 – в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, или индексируемых базой данных RSCI, или вхо-

дящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, и издания, приравненные к ним, в том числе 21 работа в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и WoS, 4 патента РФ.

Внедрение результатов исследования. Результаты исследования внедрены в учебную и методическую работу кафедр ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, в работу хирургических отделений ГБУЗ «ККБ № 2», ГБУЗ ККБ СМП; ожоговых отделений ГБУЗ «НИИ – ККБ № 1 им. С.В. Очаповского», в научную работу лаборатории разработки и изучения новых технологий лечения заболеваний ГБУЗ «НИИ – ККБ № 1 им. С.В. Очаповского», а также в работу по производству раневых покрытий на предприятие ООО «АБ МЕДИКАЛ».

Личный вклад автора состоял в постановке цели и формировании научных задач, научно-информационном поиске и анализе литературных данных. Участие автора более 85 % в сборе и обработке литературных источников, проведении лабораторных исследований и экспериментов. Самостоятельно проведено обобщение и анализ полученных материалов, статистическая обработка результатов, написан текст диссертации и иллюстративный материал, сформулированы выводы, а также внедрение в практику результатов диссертационной работы.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 222 страницах машинописного текста и состоит из введения, 8 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, иллюстрирована 14 таблицами и 84 рисунками. Список литературы содержит 320 источников, из которых 46 отечественных и 274 зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было одобрено локальным Независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (протокол № 96 от 29.01.2021 г.). Все манипуляции с лабораторными животными соответствовали требованиям Приказа Минздрава России от 23.08.2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики», комитета по биоэтике и Федерального закона РФ о защите животных (ст. 4 Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.12.1999 г.), Приказа Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных «European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123)» (Strasbourg, 1986).

Исследование проводилось на базе центральной научно-исследовательской лаборатории, учебно-производственного отдела (вивария), кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО Кубанского государственного медицинского университета Минздрава России (г. Краснодар).

Основой для создания ксенодермальных биоматериалов была нативная кожа поросят породы Ландрас возрастом 3,5–5,5 месяца (n = 4). Забор дермы проводили с боковых поверхностей и спины животных, донорский участок ко-

жи предварительно обрабатывали, затем удаляли эпидермис с помощью электродерматома, после чего забирали образцы дермы.

Для проведения децеллюляризации и химической обработки образцов дермы использовались следующие реагенты: детергенты: тритон X-100 («Sigma-Aldrich», США), дезоксихолат натрия («Sigma-Aldrich», США); химические агенты: NaOH (Вектон, Россия), H₂O₂ (Йодные Технологии и Маркетинг, Россия), борная кислота (Реахим, Россия), ЭДТА (ThermoFisher Scientific, США), KCl (Реахим, Россия), NaCl (Реахим, Россия), CaCl₂ (Реахим, Россия), фосфатный буфер (Gibco, Великобритания); ферменты: Трипсин-Версен («Биолот», Россия), свиная панкреатическая ДНК-аза I 2000 ЕД («Sigma-Aldrich», США).

После децеллюляризации дермы в образцах определяли содержание остаточной ДНК с использованием набора реагентов для выделения ДНК Dneasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Швеция) по протоколу фирмы-изготовителя с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific Inc., США). Критерием качества имплантируемых биологических материалов в отношении количества ДНК считали концентрацию менее 50 нг/мг ткани [P.M. Sgaro et al., 2011]. Для определения наличия интактных ядер к образцам добавляли 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (Sigma Aldrich, США), разведение 1 : 1000, и инкубировали в темноте в течение 5 минут.

В образцах биопластических материалов проводили количественное определение содержания коллагенов (набором реагентов «ELISA Kit for Collagen Type I (COL1)» (Uscn Life Science & Technology Co., USA)); гликозаминогликанов (набором реагентов «Blyscan™ Glycosaminoglycan Assay» (Biocolor Ltd. Northern Ireland, U.K.)); гиалуроновой кислоты (набором реагентов «Blyscan™ Glycosaminoglycan Assay» (Biocolor Ltd. Northern Ireland, U.K.)) по протоколам фирмы производителя.

Для общегистологической оценки образцов биопластических материалов (окраска гематоксилином/эозином, трихромом по Массону, по Ван Гизону) при помощи ротационного микротома RM2235 (Leica, Германия) получали парафиновые срезы толщиной 4 мкм на высоко адгезивных стеклах с последующей депарафинизацией, гидратацией, окрашиванием. Все образцы до и после имплантации исследовали с помощью микроскопа Olympus CX 41 (Olympus, Япония) при различном увеличении.

При проведении теста на цитотоксичность использовали линию человеческих дермальных фибробластов DF-1. Клетки инкубировали в среде DMEM (Gibco, Англия) с образцами биоматериалов в течение суток, затем проводили окрашивание флуоресцентными красителями кальцеином-AM и гомодимером этидия, входящими в состав тест-системы Live/Dead (ThermoFisher Scientific Inc., США), согласно инструкции производителя. Визуализация флуоресцентного свечения проводилась на флуоресцентном микроскопе Olympus IX 51 (Olympus, Япония) с использованием соответствующих светофильтров с помощью программного обеспечения Olympus CellSens Entry (Olympus, Япония). Количественный учет площади и интенсивности флуоресцентного окрашивания проводился с использованием программы ImageJ (National Institution of Health, США).

Для анализа жизнеспособности клеток образцы ацеллюлярного дермального матрикса инкубировали с клетками в течение 3 часов в темноте в присут-

ствии желтой соли тетразолия (МТТ), затем добавляли раствор 10 % додецилсульфата натрия в 0.01 М HCl и инкубировали 1 час. Интенсивность протекания реакции восстановления МТТ оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific Inc., США) при длине волны 560 нм согласно инструкции производителя.

Для сравнительной оценки механических свойств АДМ все биологические образцы были разделены на 3 группы по 15 образцов в каждой. В первую вошли образцы АДМ, во вторую группу – образцы разрешенного к применению в РФ ксенотрансплантата для герниопластики «Permacol Surgical Implant®», «Covidien» (Франция). Контрольную группу составили нативные образцы свиной дермы, не прошедшие обработку. Исследование напряжения, относительной деформации при разрыве и начального модуля упругости образцов было проведено с помощью универсальной разрывной машины Instron 1122 (Instron, США). Был применён следующий режим испытаний: скорость растяжения 20 мм/мин, температура 23 ± 1 °С, влажность – 45 %, давление – 762 мм. рт. ст. Базовая длина образцов – 30 мм, испытания – во влажном состоянии.

Для засеивания АДМ использовали аллогенные фибробласты, рецеллюляризацию проводили статическим методом в 6-луночной планшете клеточной суспензией из расчета 25000 кл/см² в течение 48 часов в CO₂-инкубаторе.

Подкожная имплантация образцов биоматериалов была выполнена самцам крыс породы Wistar (n = 30), возрастом 6 месяцев, массой 260 ± 20 г. Животных наркотизировали растворами Золетила 100 (14 мл/кг; Virbac, Франция) и Седамидина (1,2 мл/кг; ВИК – здоровье животных, Россия), затем выполняли введение исследуемых материалов под кожу в межлопаточной области, образцы исследуемых материалов помещались в подкожный карман на холке крысы. На 7-е, 14-е, 21-е и 60-е сутки после подкожного введения биоматериалов выполняли эксплантацию образцов, проводили их гистологический анализ.

Эксперимент по закрытию модели ожоговой раны проводили на поросятах породы Ландрас (возраст 15 недель, масса 25,5 кг). Закрытие грыжевого дефекта было выполнено на двух свиньях-грыженосителях породы Ландрас возрастом 4–6 месяцев массой $27 \pm 6,1$ кг. Моделирование субпекторального кармана проводилось на двух свиньях породы Ландрас (возраст 4 месяца, самки, вес $33 \pm 1,7$ кг).

Экспериментальное применение дермального гидрогеля было проведено на 60 половозрелых самцах крыс породы Сфинкс массой 160–200 г. Крысы были разделены на три группы: группа 1 – крысы без лечения, или контрольная группа (n = 20), группа 2 – крысы с лечением мазью «Левомеколь», или группа сравнения (n = 20), и группа 3 – крысы с лечением дермальным гидрогелем, или опытная группа (n = 20). Всем животным под общим ингаляционным наркозом «Изофлуран» в области холки наносили контактные ожоговые раны с помощью металлического груза массой 100 г и диаметром 3 см, нагретого до 100 °С в кипящей воде, в течение 15 с. Раны крыс групп 2 обрабатывали комбинированной противомикробной мазью «Левомеколь®» (диоксометилтетрагидропиримидин + хлорамфеникол) (ООО «НИЖФАРМ», Россия), а крыс группы 3 дермальным гидрогелем в объёме 0,3 г каждый день до 7-го дня эксперимента включительно. Всем животным после оперативного вмешательства вводился анальгезирующий препарат «Флекспрофен 2,5 %» (5 мг кетопрофена/кг; «Нита-Фарм», Россия) и антибиотик

«Конвенция» (5 мг/кг; «Zoetis», США). Образцы кожи у крыс брались с помощью устройства для биопсии кожи диаметром 8 мм («Medax», Италия) на 3-и, 7-е и 14-е сутки с прилежащими тканями для гистологического исследования.

Для гистологической оценки тканей выполняли окрашивание гематоксилином-эозином, по Массону (БиоВитрум, Россия) по инструкции изготовителя, использовали компьютерную морфометрию с помощью программного обеспечения Image J (National Institution of Health, США) и плагина ИНС metrics».

При иммуногистохимическом исследовании использовали поликлональные антитела к CD3 (кат. номер ab11089, Abcam, Великобритания), к CD16b (кат. номер ab89207, Abcam, Великобритания), к CD68, (кат. номер ab955, Abcam, Великобритания), anti-Vimentin antibody (кат. номер ab8978, Abcam, США), Anti-pan Cytokeratin antibody (кат. номер ab7753, Abcam, США), к фибронектину (кат. номер FNab03122, FineTest, Китай), к коллагену I (кат. номер FNab01836, FineTest, Китай) и IV типа (кат. номер FNab01844, FineTest, Китай) согласно инструкции производителя. При количественном подсчёте результатов иммуногистохимического исследования использовали программное обеспечение Image J (National Institution of Health, США) и плагин ИНС metrics. Рассчитывали КПО – коэффициент площади окрашивания, который представляет собой отношение площади, занимаемой иммунореактивным цветным продуктом, к общей площади среза.

Содержание интерлейкина-1 бета (IL1 β), интерлейкина-4 (IL4), интерлейкина-6 (IL6), интерлейкина-8 (IL8), интерлейкина-10 (IL10), фактора некроза опухоли альфа (TNF α), фактора роста тромбоцитов (PDGF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), трансформирующего фактора роста бета (TGF β 1) и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1) определяли в сыворотке крови животных методом твердофазного иммуноферментного анализа на анализаторе Filter Max F5 («Molecular Devices», США) с использованием наборов реагентов ELISA («Cloud-Clone Corp.», Китай) согласно протоколу производителя.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Office 2016, Graph Pad Prism version 6.04 (США). Применялись методы дескриптивной статистики, анализ средних и распределений ($M \pm SD$), медианы с первым и третьим квартилем ($Me [Q_1; Q_3]$), квинтилей и ранговых статистик, проводилось построение кривых распределений с последующей нормализацией, а также вычисление абсолютных и относительных частот изучаемых показателей. Достоверность различий между показателями оценивали в зависимости от характера распределения данных в выборках, с помощью стандартных критериев значимости: χ^2 Пирсона, F-критерия Фишера, для сравнения независимых групп использовали критерий Манна-Уитни, для сравнения зависимых групп использовали критерий Вилкоксона. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка биопластического материала – ацеллюлярного дермального матрикса (АДМ) в качестве раневого покрытия

Для обработки дермы и получения АДМ в качестве раневого покрытия нами был разработан алгоритм децеллюляризации на основе детергент-энзиматического метода, который позволяет наиболее полным образом удалить

клетки из тканей, но в то же время обладает щадящими свойствами по отношению к белкам волокон ВКМ. В основе алгоритма лежит использование водных растворов трипсина, дезоксихолата натрия и тритона X-100. Краткий алгоритм обработки представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Краткий алгоритм детергентно-энзиматической обработки дермы для получения АДМ в качестве раневого покрытия

Циклы	Реагент/воздействие	Время, ч	Температура, °С	Режим, об/мин
1	замораживание	72	-80	–
	трипсин-Версен 1 : 1	18	+37	170
5	тритон X-100 1 %	2	+20–25	170
	дезоксихолат натрия 4 % + Na ₂ -ЭДТА 0,002М	2	+20–25	170
1	панкреатическая ДНКаза I, 2000 ЕД	4	+37	100

Окрашивание гематоксилином и эозином, проводимое после каждого цикла обработки детергентами, показало, что сохраняемые клетки и клеточные ядра в матриксе отсутствовали уже после второго цикла обработки, однако, большое количество базофильно окрашенных нитей матрикса, присутствовавшее в срезах, и высокое количественное содержание ДНК в тканях продиктовали необходимость увеличения количества циклов обработки до пяти (рисунок 1).

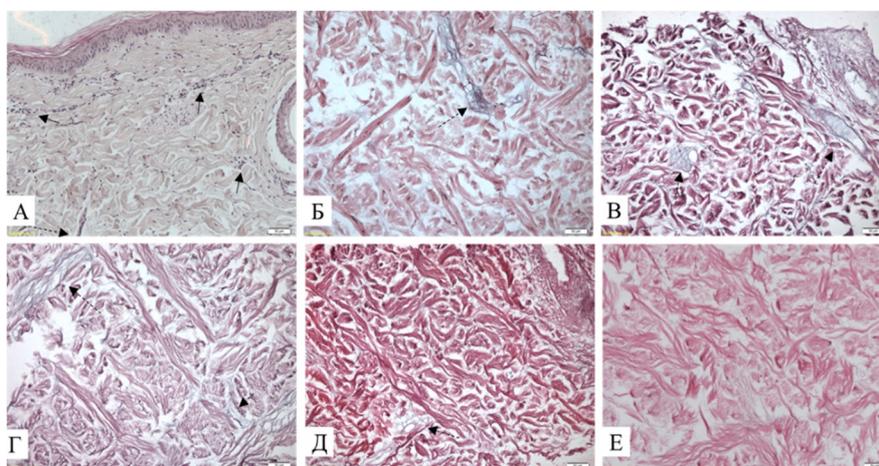


Рисунок 1 – Динамика изменений структуры ВКМ дермы в процессе децеллюляризации: А – нативная дерма; Б–Е – дерма после 1–5 цикла обработки детергентами соответственно. Сплошные стрелки указывают на интактные ядра. Пунктирные стрелки указывают на разрушенные ядра. Окрашивание гематоксилин-эозином. Ув. ×200

Тест на наличие интактных ядер и ядерного материала (окраска ДНК в образцах дермы с помощью флуорофора DAPI) подтвердил эффективность использования предложенной методики, так как была обнаружена лишь незначительная флуоресценция остаточного ДНК и аутофлуоресценцию волокон ВКМ по сравнению с нативной дермой, где клеточные ядра активно флуоресцировали и были выявлены в большом количестве (рисунок 2).

Количественный анализ показал, что содержание ДНК в децеллюляризованной дерме после пятого цикла обработки снижалось до 13,7 % ($45,4 \pm 2,8$ нг/мг ткани) по сравнению со значениями нативной дермы ($p < 0,05$).

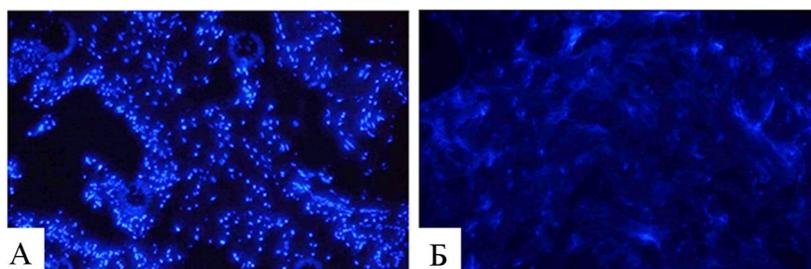


Рисунок 2 – Результаты определения наличия интактных ядер: А – образцы нативной дермы; Б – образцы АДМ. Окрашивание DAPI. Ув. $\times 200$

МТТ-тест выявил живые, метаболически активные клетки при инкубации опытных образцов АДМ с дермальными фибробластами, выделенными из кожи свиньи. Дифференциальное выявление живых (флуоресценция с кальцеином) и мертвых (флуоресценция с гомодимером этидия) клеток, позволило дополнительно визуализировать живые клетки во время статичной рецеллюляризации образцов АДМ (рисунок 3).

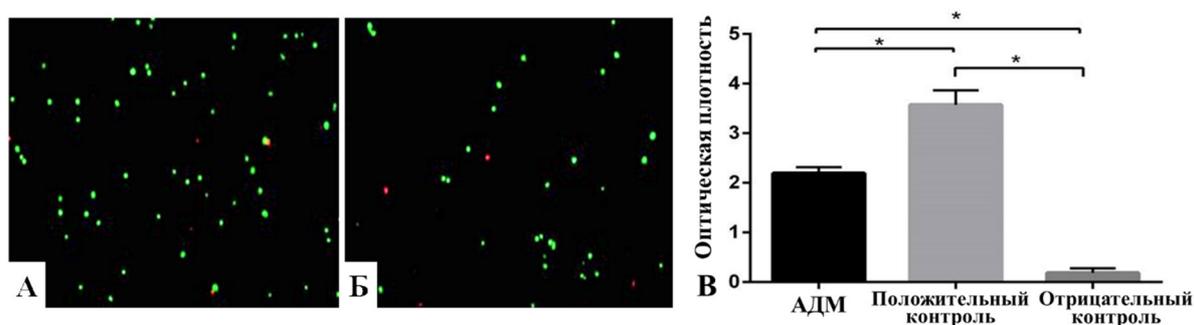


Рисунок 3 – Оценка цитотоксичности образцов АДМ через 24 часа после инкубации: А – контроль; Б – АДМ, окрашивание методом Live/Dead, ув. $\times 100$; В – результаты МТТ-теста

Таким образом, проведенный анализ эффективности методики децеллюляризации дермы показал, что предложенный алгоритм эффективно удаляет клетки и ядерный материал, при этом архитектура межклеточного вещества незначительно изменяется, так как происходит частичное разрушение волокнистых структур. При оценке биосовместимости образцов АДМ было показано, что исследуемые материалы не обладают цитотоксичностью, что говорит о достаточно небольшом остаточном содержании в матриксе детергентов – дезоксихолата натрия и тритона X-100.

Результаты сравнительной оценки эффективности применения ацеллюлярного дермального матрикса для лечения ожоговых ран в эксперименте

На боковой поверхности свиньи породы Ландрас были сформированы раны двух типов: 1) рана размером 15×5 см, у которой дном являлись нижние слои дермы и мозаично обнажённые участки подкожно-жировой клетчатки (проксимальнее – ближе к позвоночнику). Данная рана по глубине поражения соответствовала IIIА степени по классификации Вишневецкого; 2) рана размером 15×5 см, у которой дном служили поверхностная фасция и мышечная ткань (IV степень) для получения гранулирующей раны через 7–8 дней.

Раны первого типа были сразу закрыты образцами раневых покрытий (размерами $2,5 \pm 0,7$ см \times $4 \pm 0,9$ см \times $0,03 \pm 0,01$ см), расстояния между раневыми покрытиями составило 1–2 см: 2 образца были представлены АДМ, 2 образца рещеллюляризованных дермальными аллофибробластами матриксами и 1 образец аутокожи в качестве контроля, а раны второго типа через 8 дней (рисунок 4).

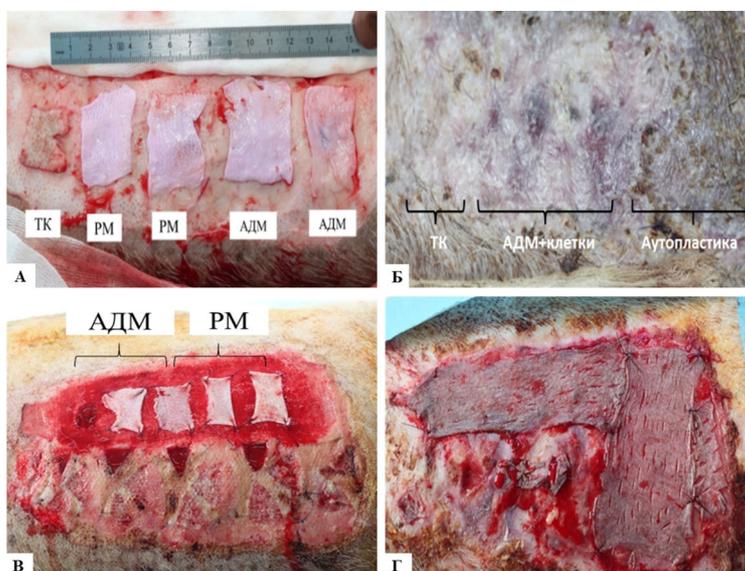


Рисунок 4 – А – фиксация исследуемых раневых покрытий на рану первого типа (модель ожога IIIA степени); Б – вид раны на 30-е сутки после начала эксперимента; В – фиксация исследуемых раневых покрытий на гранулирующую рану; Г – закрытие раневой поверхности свободной кожей аутопластикой на 20-е сутки эксперимента; ТК – толстая кожа; АДМ – ацеллюлярный дермальный матрикс; РМ – рещеллюляризованный дермальный матрикс

При наблюдении за ранами отмечалась различная динамика их заживления в зависимости от применяемого экспериментального матрикса и типа раны. В частности, в чистой ране к 12 суткам, раневое покрытие, представленное АДМ, становилось сухим и уплотнялось, свободно открепляясь от поверхности раны, что потребовало иссечения сформированной под ним рубцовой ткани и последующей свободной кожной аутопластики расщеплёнными трансплантатами на 20 сутки после начала эксперимента, так как кожный покров не восстанавливался. На гранулирующей ране (рана второго типа) матриксы лизировались и не приживались, что также потребовало проведения аутопластики расщепленным свободным лоскутом. Через 10 дней после аутопластики наблюдалась полная ячеичная эпителизация раневой поверхности. В отличие от АДМ, рещеллюляризованные аллогенными фибробластами образцы, продемонстрировали адгезию к раневой поверхности. К 30-м суткам рещеллюляризованные матриксы свободно откреплялись, но под ними был восстановлен полностью кожный покров, что не требовало дальнейшей аутодермопластики (рисунок 4, Б).

Гистологический анализ исследуемых раневых покрытий на чистой ране выявил отличия в участках раны, закрытых АДМ и рещеллюляризованными дермальными матриксами. Исследование динамики содержания виментина – белка промежуточных филаментов соединительных тканей при закрытии ожоговой раны АДМ показало его накопление на 8-е сутки эксперимента – КПО составил $10,69 \pm 2,17$ %. Экспериментальное лечение ожоговой раны рещеллюляризованным матриксом показало его накопление на 16-е сутки – КПО со-

ставил $26,79 \pm 5,41 \%$ против $10,08 \pm 3,12 \%$ в области закрытия АДМ на 5-е сутки после нанесения раны. На вторые сутки после экспериментального лечения с помощью АДМ в подлежащих тканях развивалась слабовыраженная воспалительная реакция с лимфомакрофагальной инфильтрацией и пропитыванием матрикса фибрином и эритроцитами (рисунок 5).

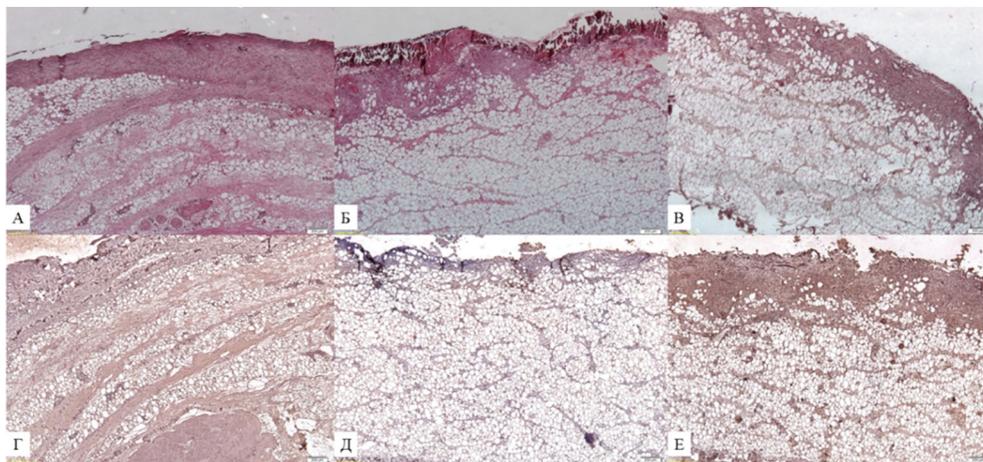


Рисунок 5 – Морфологический анализ результатов имплантации АДМ: А, Г – 2 сутки; Б, Д – 5 сутки; В, Е – 8 сутки послеоперационного периода; А–В – окрашивание гематоксилином-эозином. Ув. $\times 40$; Г–Е – иммуногистохимическая реакция с антителами к виментину – белку промежуточных филаментов соединительных тканей. Ув. $\times 100$

К 8 суткам послеоперационного периода в ране наблюдалась значительная пролиферация фибробластов в прилегающем к матриксу участке дна раны, их количество достигало 125 ± 37 в поле зрения при увеличении $\times 200$, что привело к формированию рубцовой ткани. Новый дермальный слой под покрытием не формировался.

Морфологический результат применения рецеллюляризованного аллофибробластами дермального матрикса как раневого покрытия существенно отличался от АДМ. На 2–5 сутки после операции нами была отмечена плотная адгезия имплантата к ране. Морфологическое исследование биоптатов показало, что на 2–5 сутки также развивалась слабовыраженная воспалительная реакция, однако она происходила только в верхних участках раны, граничащих с матриксом, также было отмечено появление дермального слоя толщиной до 200 мкм на 5 сутки эксперимента. В последующие сутки под рецеллюляризованным матриксом толщина новообразованного дермального слоя продолжала увеличиваться, в формирующейся дерме выявляли вновь образованные сосуды, формировался плоский неороговевающий эпителий с выраженными признаками пролиферации базального слоя. На 20-е сутки после трансплантации толщина новообразованной дермы возросла до 2,5 мм, увеличилось количество интрадермальных придатков кожи. К этому сроку имплантированный матрикс самопроизвольно открепился от поверхности новообразованного под ним эпидермиса.

Через 5 месяцев после проведения экспериментального лечения было также выполнено гистологическое исследование участков кожи свиньи, на которых моделировалась ожоговая рана. Из полученных данных видно, что толщина вновь сформированной дермы была сопоставима в участках, закрытых исследуемым раневым покрытием (АДМ, засеянный аллогенными дермальными фибробластами) и аутодермопластикой – $19621 \pm 56,3$ мкм и $1738 \pm 67,9$ мкм соответственно

($p > 0,05$), но не достигала значений на участках, закрытых аутокожей – $2596,2 \pm 69,1$ мкм ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$ соответственно) (рисунок 6).

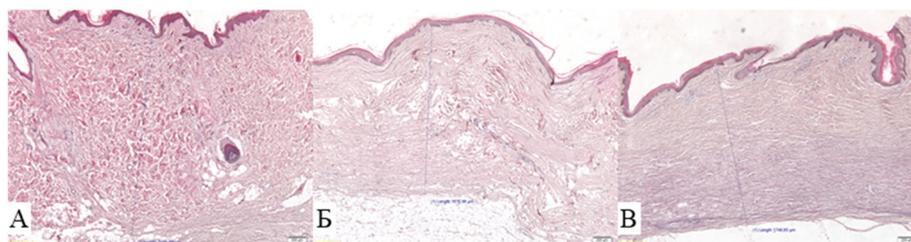


Рисунок 6 – Морфологический анализ участка раны через 5 месяцев после лечения:
 А – закрытие толстой кожей; Б – закрытие рецеллюляризованным дермальным матриксом;
 В – закрытие с помощью расщепленного лоскута.
 Окрашивание гематоксилином-эозином. Ув. $\times 40$

Таким образом, под рецеллюляризованным матриксом в чистой ране произошло полное восстановление всех слоев кожного покрова с формированием полноценных дермального и эпидермального слоев.

Разработка биопластического материала – ацеллюлярного дермального матрикса для реконструктивной хирургии

Для разработки АДМ применяемого в реконструктивной хирургии – фиксирующего биоматериала (АДМ – ФБ) нами была апробирована методика получения больших лоскутов дермы. С помощью электродерматома в лабораторных условиях были получены образцы дермы свиньи породы Ландрас, не содержащие эпидермиса, с равномерной толщиной образца 0,7 мм на всем протяжении, размерами не менее чем $10 \pm 0,5 \times 20$ см. Методика представляла собой следующий алгоритм: 1) в условиях операции животное в состоянии наркоза укладывали на бок, производили разметку донорского участка размером 20–25 \times 60–70 см, включающего области ягодиц, спины, боковой поверхности живота и шеи; 2) выполняли инъекционное пропитывание подкожной жировой клетчатки физиологическим раствором при помощи шприца; 3) производили одномоментный разрез кожи по намеченному контуру и равномерными пилящими движениями скальпеля по плоскости получали полнослойный кожный лоскут на всей площади забора единым образцом, включающим эпидермис, дерму и мозаичные участки жировой ткани; 4) забранный кожный лоскут помещали на валик, обрабатывали вазелиновым маслом и срезали с донорского участка дисковым электродерматомом эпидермис, на котором предварительно установлена величина зазора 0,7 мм, подготавливая лоскут к забору дермы; 5) полученный лоскут растягивали зажимами Кохера, создавая равномерное натяжение на всей площади, далее электродерматомом с диаметром дискового ножа 100 мм производили забор образцов дермы толщиной 0,7 мм в направлении, перпендикулярном направлению лоскута. В результате применения данной методики были получены 8 образцов дермы размерами не менее чем $10 \pm 0,5 \times 20$ см, которые были использованы для получения фиксирующего биоматериала для реконструктивной хирургии.

Для обработки дермы был разработан алгоритм децеллюляризации на основе детергент-энзиматического метода. В основе алгоритма было использование растворов трипсина, дезоксихолата натрия и тритона X-100. Краткий алгоритм обработки представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Краткий алгоритм детергентно-энзиматической обработки больших лоскутов дермы для получения АДМ-ФБ

Циклы	Реагент/воздействие	Время, ч.	Температура, °С	Режим, об/мин.
1	замораживание	72	-80	–
	Трипсин-Версен 1 : 1	6	+37	100
1	тритон X-100 1 %	3	+20–25	170
	дезоксихолат натрия 4 % + Na ₂ -ЭДТА 0,002М	3	+20–25	170
2	тритон X-100 1 %	3	+20–25	170
	дезоксихолат натрия 4 % + Na ₂ -ЭДТА 0,002М	3	+20–25	170
1	панкреатическая ДНКаза I, 2000 Ед/ФСБ	4	+37	100

В результате было сокращено время обработки дермы до 22 часов по сравнению с разработанным ранее алгоритмом, а также реализована возможность учитывать размеры образцов и экономить реагенты без потери эффективности удаления клеток. После обработки нативного образца детергентно-энзиматическим методом АДМ – ФБ приобрел белый цвет, имел характерный рисунок поверхности (мерею) в виде сорочьих лапок. Полученный АДМ – ФБ обладал оптимальной пластичностью для реконструктивной хирургии. Например, благодаря мягкости и эластичности матрикс было возможно моделировать по размерам и форме дефекта передней брюшной стенки (рисунок 7).

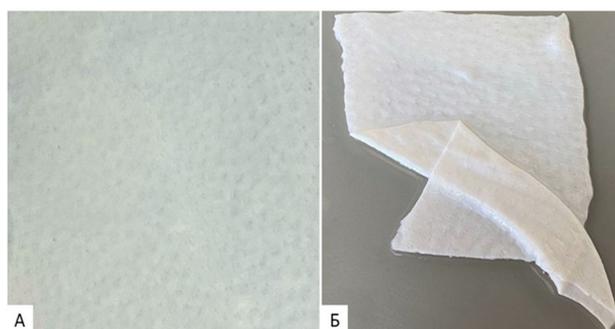


Рисунок 7 – АДМ – ФБ: А – внешний вид, структура; Б – пластичность (способность моделироваться по форме)

Результаты анализа показали отсутствие клеточных структур и частичную сохранность гистоархитектуры в дермальном матриксе по сравнению с нативной дермой (рисунок 8).

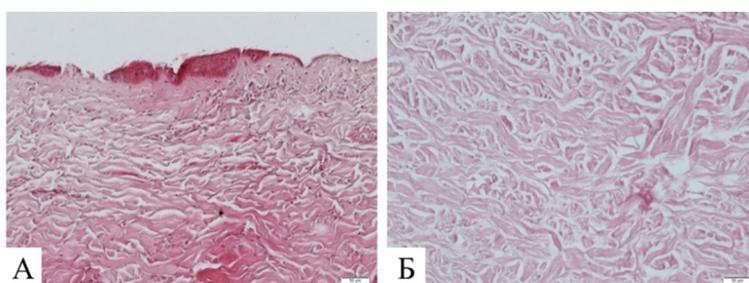


Рисунок 8 – Гистологический анализ образцов дермы до обработки (А) и после обработки (Б). Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. ×100

Коллагеновые пучки дермального матрикса и нативной дермы достоверно не отличались друг от друга по толщине ($12,06 \pm 0,03$ против $12,02 \pm 0,02$ мкм, $p > 0,05$) и упорядоченности. Площадь коллагеновых пучков в образцах АДМ –

ФБ была ниже значений данного показателя в нативной дерме вследствие набухания коллагеновых волокон в ходе обработки дермы ($78,2 \pm 2,4$ против $89,2 \pm 1,9$ %; $p < 0,05$). В нативных образцах клеточные ядра явно флуоресцировали и имели интактную форму, в отличие от образцов АДМ, где обнаружили лишь незначительную аутофлуоресценцию волокон ВКМ. Полученные образцы соответствовали требованиям, предъявляемым к качеству имплантируемых биологических материалов в отношении количества ДНК – менее 50 нг/мг ткани, которое составляло 26,7 % от содержания ДНК в нативной ткани. Анализ данных, полученных по методике Live/Dead продемонстрировал, что 80 ± 10 % клеток оставались жизнеспособными на образцах АДМ – ФБ, что свидетельствовало об отсутствии их цитотоксического действия.

Исследования биомеханической прочности полученного биопластического материала позволило определить его основные физические свойства (таблица 3).

Таблица 3 – Основные механические свойства биоматериалов, $M \pm SD$

Образец	Удлинение при разрыве ϵ_p , %	Прочность на разрыв σ_p , МПа	Модуль упругости E_0 , МПа
АДМ – ФБ	$21,1 \pm 2,3$	$9,1 \pm 0,6$	$50,0 \pm 1,6$
Нативная дерма свиньи	$25,4 \pm 4,2$	$11,6 \pm 2,8$	$56,1 \pm 9,2$
«Permacol» (продольное направление)	$29,7 \pm 2,4$	$12,0 \pm 1,7$	$47,2 \pm 6,5$
«Permacol» (поперечное направление)	$17,5 \pm 2,6^*$	$6,2 \pm 0,6^*$	$28,4 \pm 6,1^*$

* – различия значимы относительно значений нативной дермы

В проведенном исследовании установлено что, ксеногенный АДМ – ФБ, планируемый к применению в качестве эндопротеза для герниопластики, обладает высокими прочностными характеристиками, которые сопоставимы или даже выше аналогичных показателей синтетических сеток (по данным производителей). Характеристики АДМ – ФБ соответствовали прочностным показателям нативной свиной дермы. Образцы «Permacol™» также показали высокие прочностные свойства, однако эти свойства значительно различались при продольной и поперечной нагрузке на образец. При поперечной нагрузке они снижались в 1,5–2 раза, что диктует необходимость выбора правильного положения эндопротеза во время выполнения операции. Кроме того, АДМ – ФБ обладал более выраженными пластическими свойствами по сравнению с «Permacol™», что дает ему преимущество при закрытии сложных по форме грыжевых дефектов, а также минимизирует образования грубой соединительнотканной капсулы вокруг эндопротеза.

Последним этапом проверки качества децеллюляризации был сравнительный морфологический анализ результатов подкожной имплантации крысам образцов АДМ – ФБ и нативной дермы свиньи (рисунки 9).

Результаты иммунофенотипирования воспалительного инфильтрата вокруг и непосредственно внутри имплантата на различных сроках эксперимента позволили утверждать, что полученный АДМ – ФБ, по сравнению с нативной дермой свиньи, обладает минимальной иммуногенностью. В пользу низких антигенных свойств АДМ – ФБ говорит также низкое содержание CD3- и CD68-позитивных клеток по сравнению с нативной дермой и тонкая соединительнотканная капсула вокруг имплантированного фрагмента, отмеченная в срезах на 60-е сутки эксперимента.

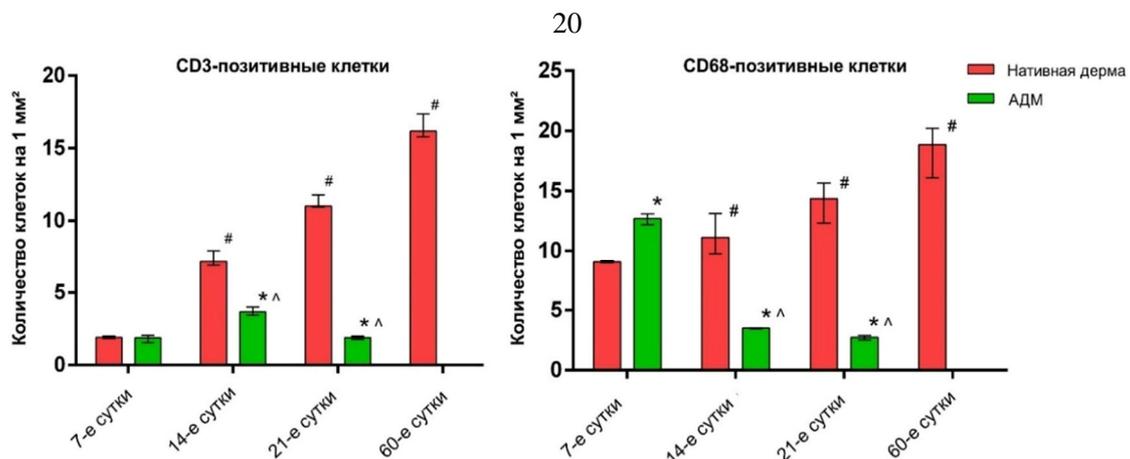


Рисунок 9 – Содержание CD3⁺ – Т-лимфоцитов и CD68⁺ – макрофагов в области имплантации в различные сроки эксперимента: * – значимость отличий между контрольной и экспериментальной группой, $p < 0,05$; # – значимость отличий для значений контрольной группы на разные сроки, $p < 0,05$; ^ – значимость отличий для значений экспериментальной группы в разные сроки, $p < 0,05$

Гомогенаты образцов АДМ, полученные по двум различным алгоритмам (для получения раневого покрытия и хирургического импланта) подвергались биохимическому анализу на содержание сульфатированных общих и О-гликозаминогликанов и гиалуроновой кислоты, для оценки сохранности небелковых компонентов ВКМ. Гомогенаты нативной дермы также подвергались данному исследованию и служили группой сравнения (рисунок 10, рисунок 11).

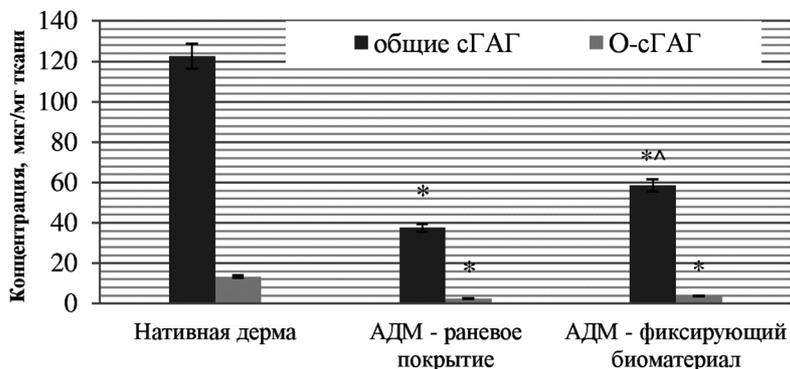


Рисунок 10 – Анализ содержания сульфатированных гликозаминогликанов в АДМ и нативной дерме: * – различия значимы относительно значений в нативной дерме; ^ – различия значимы относительно значений в раневом покрытии ($p < 0,05$), сГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны



Рисунок 11 – Анализ содержания гиалуроновой кислоты в АДМ и нативной дерме: * – различия значимы относительно нативной дермы; ^ – различия значимы относительно значений в раневом покрытии ($p < 0,05$)

Полученные данные продемонстрировали значительную потерю компонентов ВКМ в процессе детергентно-энзиматической обработки по сравнению в

исходной концентрацией различных гетерополисахаридов в нативной дерме, при этом их содержание в АДМ – ФБ, обработанном по модифицированному протоколу было значимо выше ($p < 0,05$).

Таким образом, преимуществом оптимизированного алгоритма децеллюляризации, с помощью которого возможно сохранение структуры ВКМ, является получение материалов с наиболее оптимальными биологическими и биомеханическими свойствами, в наибольшей степени приближенными к характеристикам нативной ткани, что является важным критерием для хирургических материалов.

Результаты экспериментального применения ацеллюлярного дермального матрикса в качестве хирургического импланта

Нами было проведено экспериментальное хирургическое лечение грыжи передней брюшной стенки у двух свиней породы Ландрас. Ненатяжную герниопластику методом sublay грыжевого дефекта (13 x 5 см) выполняли с помощью АДМ – ФБ (15 x 7 x 0,06 см) – опытная группа и грыжевого дефекта (11 x 7 см) с помощью коммерческого импланта Permacol™ (15 x 10 x 1 см) – группа сравнения). Хирургические импланты были закреплены несколькими узловыми швами полипропиленовыми монофиламентными нитями (1/2, 36 мм, USP 4, «Волоть», Россия). В ходе операции биопластические материалы выкраивались и располагались соответственно размерам грыжевых ворот. В течение всего эксперимента не отмечалось опущения внутренних органов, что подтверждает прочностные характеристики АДМ – ФБ и импланта Permacol™. Через 60 дней после экспериментальной герниопластики с использованием АДМ – ФБ отмечалось отсутствие таких осложнений, как адгезия матрикса к внутренним органам, образование свищей и сером. Послеоперационный рубец характеризовался выраженным развитием плотной волокнистой соединительной ткани. Ткани из области имплантации АДМ – ФБ демонстрировали развитие зрелого состоятельного рубца с большим количеством коллагеновых и эластических волокон на фоне полного отсутствия признаков воспаления (рисунок 13).

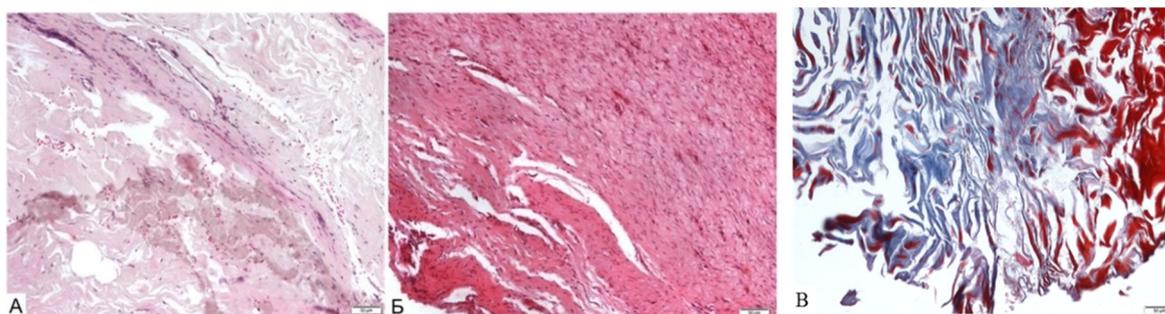


Рисунок 13 – Гистологическое исследование тканей из области имплантации АДМ – ФБ: А – послеоперационный рубец, гематоксилин-эозин; Б – место имплантации АДМ – ФБ, гематоксилин-эозин. Ув. $\times 200$; В – хорошо развитая плотная волокнистая соединительная ткань, трихром по Массону. Ув. $\times 200$

Иммуногистохимическое окрашивание продемонстрировало присутствие большого количества коллагена I типа, а также значительную часть клеток мезенхимного происхождения – в частности, фибробластов и эндотелиоцитов, которые формировали типичный пейзаж рубца.

Анализ образцов животного, которому был имплантирован Permacol™, показал, что имплант не полностью интегрировался в соединительные ткани животного. Клеточный компонент имплантата был выражен незначительно и представлял собой преимущественно фибробласты. На границе между апоневрозом и материалом Permacol™ формировались небольшие очаги липоматоза и мелкие серомы. При этом из-за достаточной жесткости, обуславливающей натяжение имплантата, сформировалось незначительное расслоение коллагеновых волокон в апоневрозе.

Результаты экспериментального применения АДМ – ФБ в качестве фиксирующего материала для маммопластики показали, что материал животного, которому был имплантирован АДМ – ФБ, характеризовался хорошей интеграцией матрикса в собственные ткани свиньи, о чём говорило отсутствие соединительно-тканной капсулы на границе между имплантом и мышечной тканью (рисунок 14, А).

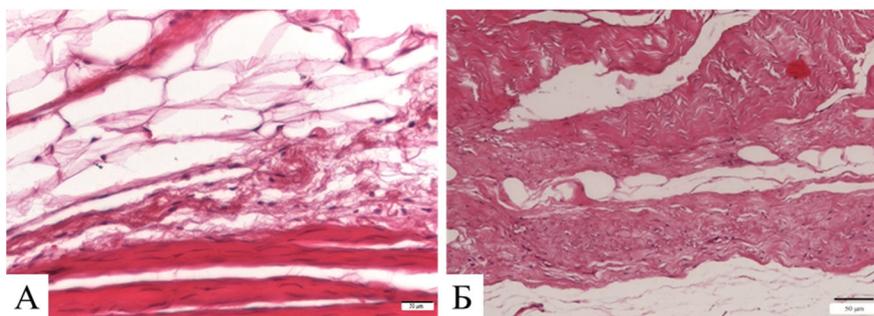


Рисунок 14 – А – граница АДМ – ФБ и апоневроза белой линии живота; Б – граница Permacol™ и белой линии живота, гематоксилин-эозин. Ув. ×400

Воспалительных изменений, в том числе затухших, выявлено не было. В образцах АДМ – ФБ был отмечен клеточный компонент, представленный фибробластоподобными клетками. Хорошо заметная граница между АДМ – ФБ и апоневрозом была обусловлена тем, что в апоневрозе все коллагеновые волокна ориентированы параллельно друг другу, а в имплантированном АДМ – ФБ их расположение разнонаправленное. В препаратах животного, у которого для маммопластики использовали Permacol™, отмечалась хорошая интеграция импланта в собственные ткани. На границе апоневроза и имплантированного материала не сформировалось соединительно-тканной капсулы, активное или разрешившееся воспаление отсутствовало. Лоскут Permacol™ характеризовался сформировавшимся клеточным компонентом, представленным в основном фибробластоподобными элементами. Визуально собственные ткани отличались от импланта более упорядоченным расположением коллагеновых волокон и отсутствием промежутков между ними. Кроме того, в отдельных полях зрения отмечалась выраженная фрагментация имплантированного биоматериала и очаговая гиперплазия адипоцитов (рисунок 14, Б).

Для оценки сохранности ВКМ в месте имплантации АДМ – ФБ было проведено исследование коллагена I типа, продемонстрировавшее его достаточно равномерное распределение, что говорит о нормальном формировании соединительной ткани, в частности, её оформленного межклеточного вещества. Известно, что коллагеновые имплантаты вызывают легкий воспалительный процесс, характеризующийся отложением компонентов ВКМ по мере деградации коллагена, с

очень незначительной васкуляризацией имплантата или без нее. Имплантаты из сшитого коллагена вызывают более интенсивный и устойчивый тканевой ответ с повышенным отложением компонентов ВКМ [А.Н. Morris et al., 2017]. В связи с этим было интересно провести сравнительную оценку иммунного ответа на разработанный матрикс и сшитый гексаметилендиизоцианатом Permacol™. Иммунофенотипирование лейкоцитов в месте имплантации АДМ не позволило обнаружить экспрессию CD3- и CD68-рецепторов, что коррелировало с авоспалительной гистологической картиной. Экспрессия PECAM-1 (CD31) была положительной в большей части капилляров в поле зрения. Равномерное распределение коллагена во всех полях зрения свидетельствовало о полноценной регенерации с формированием зрелой соединительной ткани у животного с имплантацией Permacol™. Об отсутствии иммуногенности имплантированного материала свидетельствовало отсутствие Т-лимфоцитов (CD3⁺) и макрофагов (CD68⁺) в тканевых срезах. Иммуногистохимическое выявление молекул клеточной адгезии PECAM показало положительную реакцию в большинстве эндотелиальных клеток в срезе ткани. Это говорит, с одной стороны, об адекватной регенерации в зоне операционной раны, а с другой, может служить прогностическим признаком недостаточной биодеградации импланта.

Таким образом, сравнительные морфологические результаты, полученные через 60 дней после проведения модельной маммопластики, позволили утверждать, что иммуногенность, уровень интеграции в ткани животного и темпы биодеградации у коммерческого импланта Permacol™ и АДМ – ФБ сопоставимы.

Разработка коллагенсодержащего гидрогеля на основе биополимеров дермы свиньи

Образцы дермы свиньи размерами $3 \pm 0,1 \times 3 \pm 0,1 \times 0,03$ см ($n = 25$) обрабатывали щелочным раствором с различными концентрациями гидроксида натрия: 3,5 % раствор (группа 1, $n = 5$); 4 % раствор (группа 2, $n = 5$); 4,5 % раствор (группа 3, $n = 5$); 5 % раствор (группа 4, $n = 5$); 5,5 % раствор (группа 5), при гидромодуле 1 : 5 при комнатной температуре, после чего отмывали в деионизированной воде до нейтрального значения pH. Критериями отбора для разработки оптимальной методики получения гидрогелевого материала служили: время образования прозрачного биопластического материала, время образования гелеобразной структуры, время, необходимое на достижение нейтрального значения pH образца.

В результате проведенного эксперимента оптимальные характеристики имели образцы группы 4, которые обладали меньшим временем гелеобразования по сравнению с образцами группы 2 и 3, и значительно меньшим временем нейтрализации по сравнению с образцами в группе 5 (таблица 4).

Образцы дермы группы 4, полученные после воздействия 5 % щелочного раствора в течение $6,6 \pm 1,52$ часов, приобрели упругую структуру, сохраняли форму при деформации и не продавливались пинцетом (рисунок 15).

Через $20 \pm 0,7$ часов после начала обработки образцы группы 4 приобрели структуру гидрогелевого коллагенсодержащего материала, что вероятно связано с набуханием коллагеновых волокон и объясняется нарушением структуры коллагена, а именно расщеплением коллагеновых фибрилл и разрушением невосста-

Таблица 4 – Результаты подбора оптимальной концентрации щелочного раствора для обработки дермы

Группа	1 (n = 5)	2 (n = 5)	3 (n = 5)	4 (n = 5)	5 (n = 5)
Концентрация NaOH, %	3,5	4	4,5	5	5,5
Тест на прозрачность, кол-во часов обработки	–	–	10, ± 1,14	6,6 ± 1,52	6
Образование гелеобразной структуры, кол-во часов	–	96,8 ± 1,3	47,6 ± 1,14	20 ± 0,7	21,6 ± 1,34
Время нейтрализации, ч	–	15,4 ± 1,14	20,2 ± 1,48	24,4 ± 1,14	35,72 ± 1,09
Общее время обработки, ч	–	112,2 ± 0,44	67,8 ± 1,92	44,4 ± 0,89	57,32 ± 1,55

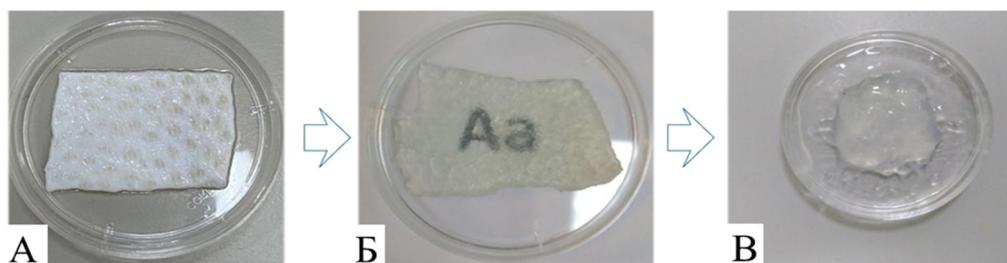


Рисунок 15 – Внешний вид образца дермы до обработки щелочным раствором (А), после 6 ч обработки 5 % NaOH (Б), после 20 ч обработки 5 % NaOH (В)

навливаемых коллагеновых шивок. Образцы данной группы соответствовали всем критериям отбора, следовательно, установленные параметры обработки были признаны оптимальными для получения гидрогеля на основе дермы в лабораторных условиях. Полученный гидрогель был прозрачным, плотным и гомогенным. В полученный гидрогель добавлялся 1 % раствор антибиотика-антимикотика (Gibco (Thermo Scientific), США) в соотношении 10 : 1 (гидрогель : раствор антибиотика), гидрогель хранился в стерильных условиях при температуре +4 °С. Образцы дермального гидрогеля, полученные химической децеллюляризацией подвергались анализу на содержание общего белка, нативного коллагена, гиалуроновой кислоты, сульфатированных общих и О-гликозаминогликанов и ДНК для оценки сохранности компонентов ВКМ. Гомогенаты нативной дермы также подвергались данному исследованию и служили группой сравнения. Количественный анализ содержания общего белка в полученном дермальном гидрогеле показал, что его концентрация составила $19,3 \pm 6,2$ г/л (рисунок 16, А).

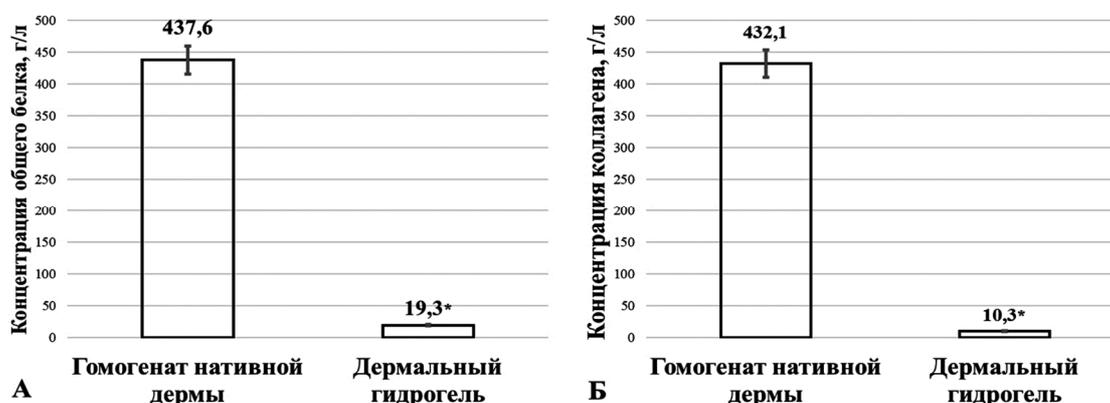


Рисунок 16 – Результаты анализа биохимических показателей дермального гидрогеля: А – содержание общего белка; Б – содержания нативного коллагена (по данным ИФА);

* – значимость различий по сравнению с нативной дермой, $p < 0,001$

Данный анализ был проведен для определения степени его вымывания из нативного образца, таким образом, в результате обработки дермы 5 % раствором NaOH произошло удаление 96,7 % белка (в сравнении с содержанием в образце дермы до обработки, $p < 0,001$). Количественный анализ содержания нативного коллагена в полученном гидрогеле для определения степени его вымывания из нативного образца представлен на рисунке 16Б. В результате обработки дермы 5 % раствором NaOH произошло удаление 97 % коллагена (10,3 г/л в гидрогеле по сравнению с 432,1 г/л – в гомогенате нативной дермы, $p < 0,001$), что объясняется его возможным разрушением (частичным гидролизом, денатурацией) и вымыванием. Количественный анализ содержания ГК в полученном гидрогеле продемонстрировал высокую степень её вымывания из нативного образца (рисунок 17, А).

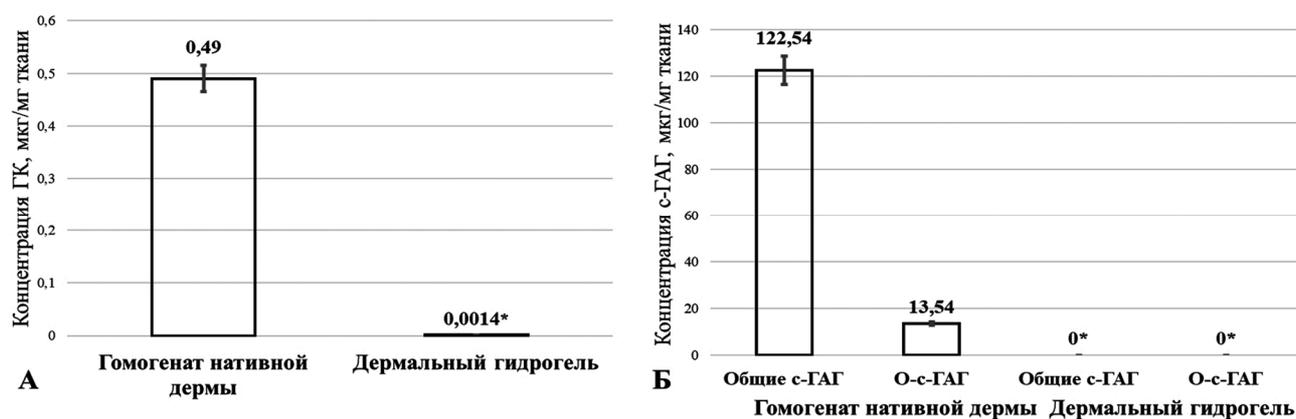


Рисунок 17 – Результаты анализа количественного определения содержания гетерополисахаридов в дермальном гидрогеле: А – концентрация гиалуроновой кислоты; Б – содержание сульфатированных гликозаминогликанов; * – значимость различий по сравнению с нативной дермой, $p < 0,001$; ГК – гиалуроновая кислота, с-ГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны

В результате обработки дермы 5 % раствором NaOH произошла полная потеря (вымывание) гиалуроновой кислоты ($p < 0,001$ в сравнении с содержанием в образце до обработки дерме).

Данные о количественном содержании сГАГ в полученном дермальном гидрогеле способствовали определению степени вымывания углеводов из нативного образца (рисунок 17, Б). Установлено, что в результате обработки дермы 5 % раствором NaOH произошла полная потеря (вымывание) О- и N-сульфатированных гликозаминогликанов ($p < 0,001$ в сравнении с содержанием в образце дермы до обработки).

По результатам окрашивания DAPI в образцах дермального гидрогеля не было обнаружено клеточных ядер, показывающих интенсивное свечение в нативной дерме. Количественный анализ показал, что в процессе обработки нативной дермы было удалено около 71 % ДНК ($54,2 \pm 17,2$ нг/мг в гидрогеле по сравнению с $183,9 \pm 12,3$ нг/мг – в нативной дерме, $p < 0,001$), это свидетельствовало о том, что полученный дермальный гидрогель был в значительной степени очищен от ДНК.

Перед проведением ХТТ-анализа проводился дозоподбор оптимального объема дермального гидрогеля для инкубации с клетками. Оптимальные результаты были получены при соотношении питательной среды и дермального гидрогеля 1,8 : 1, поэтому данное соотношение было выбрано для дальнейшего

ХТТ-анализа. ХТТ-тест показал наличие живых, метаболически активных клеток после 24 часов инкубирования. При этом жизнеспособность клеток оказалась значительно ниже, чем в контрольной лунке, тем не менее, данный показатель был принят как приемлемый в отношении цитотоксичности дермального гидрогеля. Оценка местной токсичности образцов показала, что уже на 3-и сутки в месте инъекции дермального гидрогеля на кожных покровах и в подлежащих тканях не наблюдалось признаков воспаления. При гистологическом анализе образцов на 3-и сутки не наблюдалось некроза тканей, выраженного воспалительного ответа и неоангиогенеза. Гидрогель характеризовался частичной биодеградацией, был незначительно пропитан фибринозным экссудатом, что свидетельствует о возможности его применения как основы для формирования соединительной ткани при поверхностных ранениях кожи.

Результаты исследования дермального гидрогеля показали, что его использование обуславливает высокий репаративный эффект и скорость заживления в сравнении с животными, не получавшими лечения (контрольная группа) (рисунок 18).

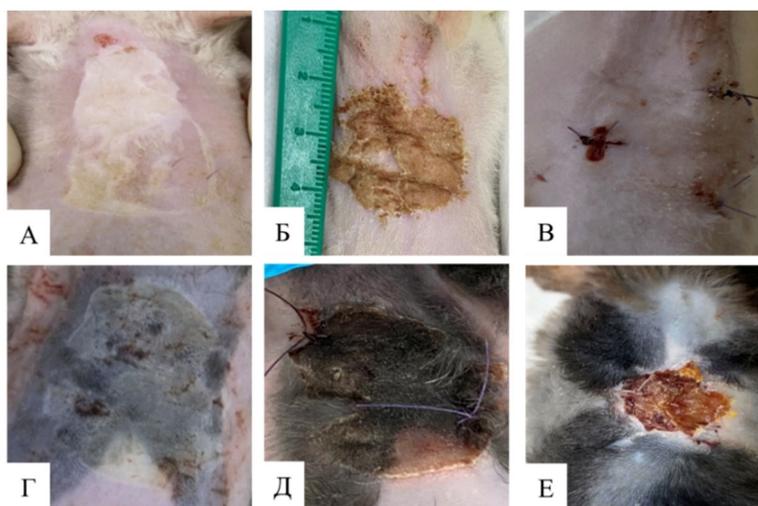


Рисунок 18 – Внешний вид животных после нанесения ожоговой раны: А, Б, В – опытная группа, лечение дермальным гидрогелем; Г, Д, Е – контрольная группа, без лечения; А, Г – день операции; Б, Д – 3 день эксперимента; В, Е – 9 день эксперимента

На третьи сутки после нанесения ожоговой раны в образцах кожи крыс, не получавших раневого покрытия, обнаруживались признаки острого воспаления и выраженного гистолиза. В тканях присутствовало большое количество нейтрофильных гранулоцитов и макрофагов по данным компьютерной морфометрии. На поверхности присутствовал фибринозно-гнойный экссудат (таблица 5). В препаратах животных, у которых в качестве раневого покрытия использовали мазь «Левомеколь», на 3-и сутки были обнаружены умеренно выраженные воспалительные явления, полнокровие сосудов, а также диффузно-очаговая воспалительная инфильтрация нейтрофильными гранулоцитами и макрофагами. Некротические и дистрофические изменения были выражены умеренно.

В образцах ран, покрытых дермальным гидрогелем, на третьи сутки отмечалось умеренно выраженное диффузное воспаление, незначительные некротические и дистрофические изменения и полнокровие сосудов. Патологоанатомический анализ биоптатов, полученных на седьмые сутки от не имевших раневого

Таблица 5 – Количественный анализ иммунофенотипирования образцов тканей ожоговых ран в экспериментальных группах

Группа/сутки	Контрольная группа (n = 20)	Группа сравнения (n = 20)	Опытная группа (n = 20)
CD16b (Me [Q₁; Q₃])			
3-и сутки	28,3 [22,6; 31,4]	17,4 [15,6; 20,9]*	16,6 [14,4; 19,2]*
7-е сутки	2,1 [1,8; 2,6] ^	2,6 [2,5; 3,1] ^	3,0 [2,4; 3,6] ^
14-е сутки	0^	0^	0^
21-е сутки	0	0	0
CD68 (Me[Q₁;Q₃])			
3-и сутки	15,9 [12,0; 19,4]	16,8 [13,8; 22,2]	11,3 [8,9; 15,0] *#
7-е сутки	8,4 [6,6; 10,9] ^	5,1 [3,9; 7,7] ^	2,9 [1,1; 4,0] ^#
14-е сутки	3,4 [2,9; 3,9] ^	2,3 [2,0; 2,7] ^	1,1 [0,7; 1,6] *#
21-е сутки	0^	0^	0^

* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы, # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения, ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе.

покрытия животных, показал умеренно выраженное слабо выраженное воспаление с незначительной макрофагальной инфильтрацией, а также активные процессы репаративной регенерации – формирование грануляционной ткани и мелкие гнезда пролиферирующего эпидермиса, дающего положительную реакцию на эпидермальный цитокератин. Особенностью опытной группы была ранняя эпителизация по сравнению с контрольной группой, т.к. КПО цитокератина на 7-й день после лечения был выше, однако к 14-м суткам количество цитокератина в образцах кожи крыс всех групп не отличалось (таблица 7). Образцы от животных, в те же сроки получавших лечение препаратом сравнения, демонстрировали слабо выраженное воспаление с небольшими очагами лимфомакрофагальной инфильтрации, выраженный отёк коллагеновых волокон и незначительное полнокровие капилляров в грануляционной ткани. Пролиферирующий эпидермис в данном случае формировал тонкий однородный пласт. В препаратах животных, ожоговая рана которых была покрыта дермальным гидрогелем, наблюдалось слабо выраженное воспаление, при котором лейкоциты формировали мелкие скопления. На 14-е сутки после нанесения ожоговой раны в образцах тканей всех трёх групп животных наблюдались статистически незначимые различия в количественном составе резидуальных воспалительных клеток в дерме, а также в плотности микроциркуляторного русла и толщине эпидермального пласта. На 14-е сутки после нанесения раны во всех группах животных макроскопический визуальный результат репаративной регенерации был также морфологически неотличим друг от друга вне зависимости от используемого экспериментального лечения. Гистоморфологические особенности заживления ожоговой раны под разными покрытиями на более ранних этапах, позволяют сделать вывод о том, что применение дермального гидрогеля было наиболее эффективно по сравнению с применением мази «Левомеколь». В образцах, покрытых дермальным гидрогелем быстрее затухало воспаление и были минимально выражены некробиотические изменения, репаративные процессы были завершены в течение двух недель после получения раны.

Для оценки влияния дермального гидрогеля на процесс восстановления кожных покровов были исследованы морфофункциональные особенности туч-

ных клеток в раневом ожоговом регенерате у крыс трех экспериментальных групп (таблица 6).

Таблица 6 – Степень дегрануляции и количество тучных клеток в образцах тканей экспериментальных групп

Группа	Контрольная группа		Опытная группа		Группа сравнения	
	СД, %	ТК, кол-во в поле зрения	СД, %	ТК, шт	СД, %	ТК, шт
3-и сутки	69,7 ± 26,8	7,2 ± 0,6	38,7 ± 18,5*	5,8 ± 0,8*#	45,7 ± 9,6*	6,2 ± 0,3
7-е сутки	48,2 ± 24,6 [^]	6,7 ± 0,3	17,7 ± 5,5*# [^]	3,2 ± 0,9*# [^]	28,7 ± 3,3* [^]	5,7 ± 0,6
14-е сутки	26,8 ± 13,3 [^]	4,8 ± 1,1 [^]	12,7 ± 8,5*#	3,5 ± 0,6*#	20,7 ± 4,8	4,5 ± 0,8 [^]

Примечание: СД – степень дегрануляции; ТК – тучные клетки: * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; [^] – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе.

Исследование показало, что во всех группах наблюдалось уменьшение числа тучных клеток при одновременном снижении степени их дегрануляции на 7-е и 14-е сутки. При этом при обработке ожоговых ран дермальным гидрогелем к 7-м суткам экспериментального лечения степень дегрануляции снизилась на 63,2 % и 38,3 % относительно контрольной группы и группы сравнения соответственно ($p < 0,05$). Известно, что при использовании коллагенсодержащих раневых покрытий коллаген способен обратимо связывать факторы роста, защищая их от протеолиза, с этим фактом возможно связать уменьшение функциональной активности тучных клеток в опытной группе в результате лечения дермальным гидрогелем.

Проведение иммуногистохимического анализа позволило выявить биохимические особенности динамики восстановления компонентов ВКМ кожи в различных группах. В восстановлении основного белка ВКМ – коллагена I типа наблюдалась положительная динамика во всех исследуемых группах, при этом на 14-е сутки в опытной группе КПО был ниже, чем в контрольной группе и группе сравнения, что может негативно влиять на биомеханические свойства кожи, но также способствовать ингибированию образования келоидных рубцов в области нанесения раны (таблица 7).

Оценка содержания белка базальных мембран коллагена IV типа показала, что во всех группах произошло восстановление концентрации данного белка до нормальных значений. Следует отметить сходную картину в увеличении КПО фибронектина во всех группах, который является адгезионным белком для коллагена ВКМ и эпителиальных клеток.

Таким образом, благодаря своим биоактивным свойствам, полученный нами дермальным гидрогель способствовал ускоренному заживлению ожоговых ран, что коррелирует с данными исследователей при изучении коллагенсодержащих ранозаживляющих покрытий. Простота и низкая себестоимость технологии получения дермального гидрогеля делают его потенциально перспективным и конкурентоспособным отечественным биологическим материалом для заживления ран.

Таблица 7 – Динамика восстановления компонентов ВКМ кожи в образцах тканей экспериментальных групп крыс

Группа	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
Коллаген I типа, КПО, %			
Контрольная группа	15,2 ± 2,2	28,0 ± 2,4 [^]	45,5 ± 3,1 [^]
Опытная группа	13,4 ± 1,9	24,9 ± 2,4 [^]	36,2 ± 2,4*# [^]
Группа сравнения	14,1 ± 1,5	26,7 ± 1,8 [^]	41,7 ± 1,1* [^]
Коллаген IV типа, КПО, %			
Контрольная группа	0	3,2 ± 0,2 [^]	4,3 ± 1,5
Опытная группа	0	3,8 ± 0,8* [^]	4,5 ± 0,9
Группа сравнения	0	2,8 ± 1,2 [^]	3,9 ± 0,6
Фибронектин, КПО, %			
Контрольная группа	0,5 ± 0,03	2,5 ± 0,04 [^]	5,2 ± 0,5 [^]
Опытная группа	0,3 ± 0,01	2,8 ± 0,03 [^]	4,8 ± 1,2 [^]
Группа сравнения	0,4 ± 0,01	2,6 ± 1,1 [^]	5,0 ± 0,8 [^]
Цитокератин, КПО, %			
Контрольная группа	0	1,4 ± 0,2	7,2 ± 0,4
Опытная группа	0	0,7 ± 0,3*	6,0 ± 0,5
Группа сравнения	0	1,5 ± 0,2	7,3 ± 0,2

* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы, # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения, ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе. КПО – коэффициент площади окрашивания.

Динамика изменения содержания про- и противовоспалительных факторов сыворотки при экспериментальном лечении ожоговых ран крыс

В ходе сравнительного анализа уровней провоспалительного цитокина IL1 β в сыворотке крови крыс было выявлено, что после нанесения ожоговой раны значение данного параметра повышалось в экспериментальных группах относительно контрольной группы (крысы, не получавшие лечение) (рисунок 19). Через три дня лечения в опытной группе (лечение дермальным гидрогелем) и группе сравнения (лечение мазью «Левомеколь») наблюдалось снижение уровня IL1 β по отношению к предыдущему сроку исследования ($p > 0,05$), при этом не были достигнуты значения контрольной группы.

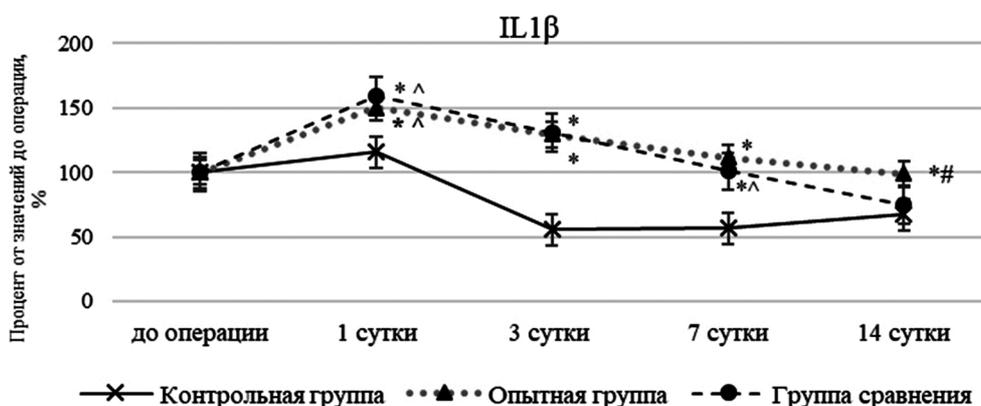


Рисунок 19 – Относительное изменение уровней IL1 β при лечении ожоговых ран крыс в динамике (значения до эксперимента принято за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Отмечалось относительное снижение уровня IL1 β в контрольной группе отношению к группам с лечением дермальным гидрогелем и мазью «Левомеколь», что было обусловлено терапевтическими эффектами препаратов и соответствовало данным гистологического анализа. К 14-м суткам относительные показатели IL1 β в контрольной группе и в группе сравнения не отличались ($p > 0,05$) и были ниже значений опытной группы ($p < 0,05$), что может говорить о выраженном противовоспалительном эффекте и пролонгированном действии гидролизатов коллагена и компонентов ВКМ, являющихся основой дермального гидрогеля.

В исследовании были выявлены значительные относительные повышения уровней IL6 на 3-и – 14-е сутки эксперимента в опытной группе и группе сравнения на фоне контрольной группы ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$ соответственно), при этом на 14-е сутки по отношению к дооперационному состоянию наблюдалась стабилизация уровней IL6 в группе животных получающих лечение (970,2 [812,4; 1023,8] пг/мл против 450,5 [329,8; 497,2] пг/мл при лечении дермальным гидрогелем, $p < 0,05$; 756,2 [587,8; 783,6] пг/мл против 403,2 [389,2; 536,8] пг/мл в группе сравнения, $p > 0,05$). Характер изменения концентраций IL6 может быть обусловлен его хемотаксическими свойствами по отношению к нейтрофилам на ранних сроках репарации и к макрофагам на более поздних стадиях заживления ожоговой раны. При сравнении групп не было выявлено значимой разницы на 3-и, 7-е и 14-е сутки у крыс с лечением дермальным гидрогелем, а также в группе сравнения по отношению к контрольной группе, что свидетельствовало о более физиологичном затухании воспалительных процессов в группах с экспериментальным лечением, так как у крыс, не получавших лечения не было отмечено повышений уровня провоспалительного IL6 на протяжении всего эксперимента.

Концентрация IL8 значительно повышалась на 1-е сутки после нанесения экспериментальной раны только в контрольной группе. Применение традиционной и экспериментальной лечебной терапии оказало значимое влияние на уровень данного цитокина в течение 3-х суток репарационного процесса. Исходя из полученных данных можно сделать вывод о положительном влиянии дермального гидрогеля на основе гидролизатов коллагена на поздние сроки заживления, так как динамика изменения уровня IL8 в группе сравнения значимо отличалась по отношению к контрольной и опытной группе на 7-е и 14-е сутки после нанесения ожоговой раны (рисунок 20).

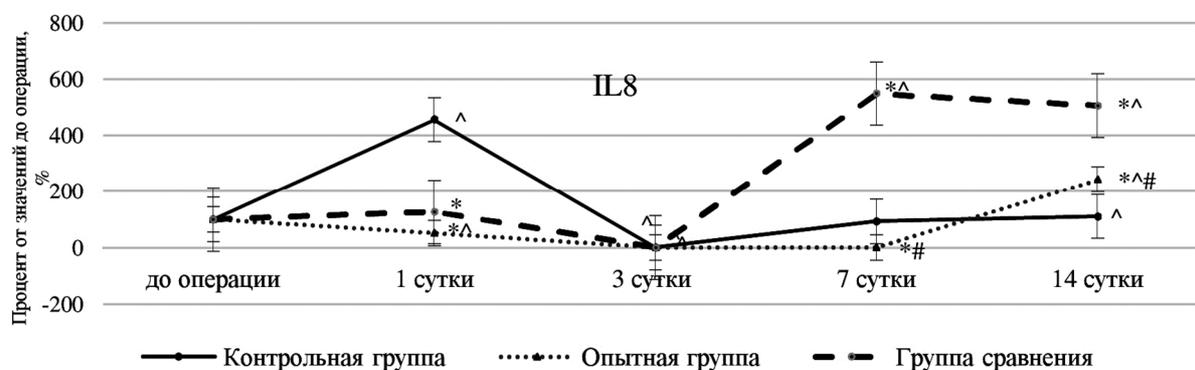


Рисунок 20 – Относительное изменение уровней IL8 при лечении ожоговых ран крыс в динамике (значения до эксперимента принято за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Таким образом, внесение компонентов ВКМ способствовало негативной регуляции в отношении роста концентрации хемоаттрактанта IL8 на более поздних сроках заживления и обеспечивало затухание воспаления.

Анализ данных, полученных при определении содержания TNF α , показал, что профили данного провоспалительного фактора в группах с лечением значительно отличаются по отношению к контрольной группе и демонстрируют способность вносимых препаратов влиять на регуляцию воспалительного ответа, тем самым оптимизируя сроки эпителизации. Кроме того, динамика изменения концентраций TNF α в экспериментальных группах не коррелировала с другими провоспалительными цитокинами – IL1 β , IL6 и IL8 (рисунок 21).

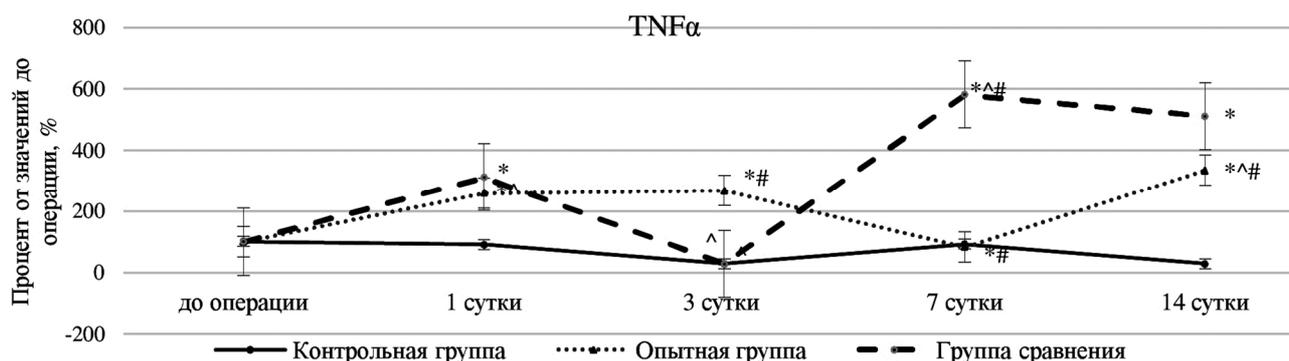


Рисунок 21 – Относительное изменение уровней TNF α при лечении ожоговых ран крыс в динамике (значения до эксперимента принято за 100 %); * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

В группе сравнения уровень TNF α отличался резкими колебаниями, что могло оказать влияние на увеличение сроков формирования всех слоев эпителия, при этом на 1-е сутки после нанесения ожоговой раны относительное содержание TNF α в сыворотке крови животных этой и опытной группы было выше по отношению к контрольной группе. В опытной группе на 7-и сутки наблюдалось снижение концентрации TNF α в отличие от предыдущего срока исследования ($p < 0,05$), а также его повышение к 14-му дню эксперимента. Общая динамика данного цитокина свидетельствует о том, что лечение биополимерами ингибирует синтез TNF α , снижает интенсивность воспалительного процесса, так как сроки заживления в экспериментальных группах были меньше, чем в группе без лечения, то данная тенденция может иметь регуляторное значение.

Следующим этапом исследования была сравнительная оценка уровней провоспалительных цитокинов на различных сроках экспериментального лечения ожоговой раны. Так изменение уровней IL4 продемонстрировало его положительное влияние на динамику заживления раны, так как он значительно повысился на первые сутки исследования, а затем к 14-м суткам не оказывал влияния в группе крыс, не получавших лечения. В группе сравнения наблюдалось самое позднее повышение уровня IL4, он был значимо выше контрольной группы на 7-е сутки эксперимента. На стадии ремоделирования и активного коллагеногенеза (вторая неделя после нанесения раны) IL4 активно синтезировался в опытной группе, но не достиг значения первых суток после нанесения раны (рисунок 22).

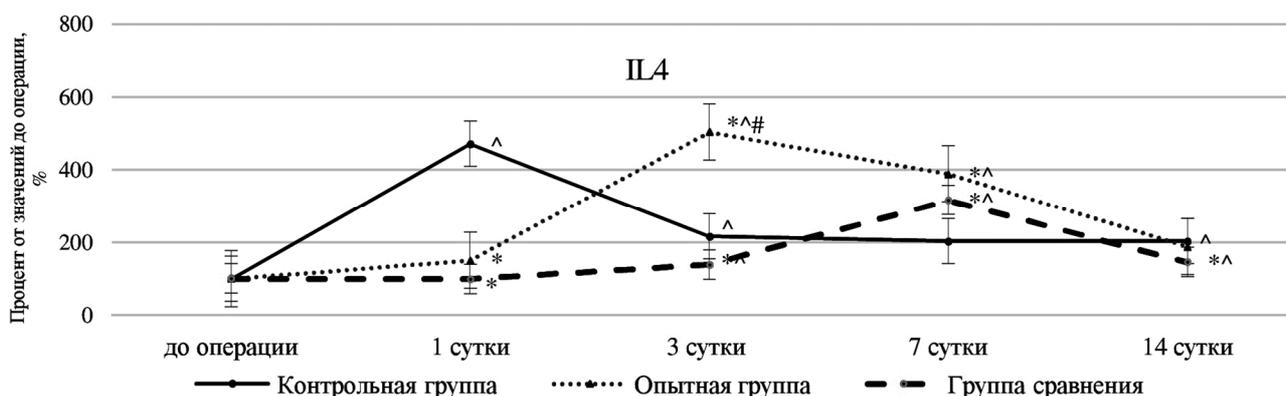


Рисунок 22 – Относительное изменение уровней IL4 при лечении ожоговых ран крыс в динамике (значения до эксперимента принято за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Дополнительное внесение дермального гидрогеля позволило значимо улучшить количество синтеза IL4 на 3-и сутки, но не способствовало процессам заживления на 14-е сутки, так как наблюдалась отрицательная динамика изменения его концентрации, как и в группе сравнения, при этом относительные значения не отличались от контрольной группы на 14-е сутки эксперимента.

Основным противовоспалительным маркером для сравнительной оценки процессов заживления ожоговой раны был IL10. Анализ полученных данных о концентрациях IL10 показал, что группа лечения дермальным гидрогелем и группа лечения мазью «Левомеколь» не имели значимых различий на 1-е и 3-и сутки исследования (рисунок 23).

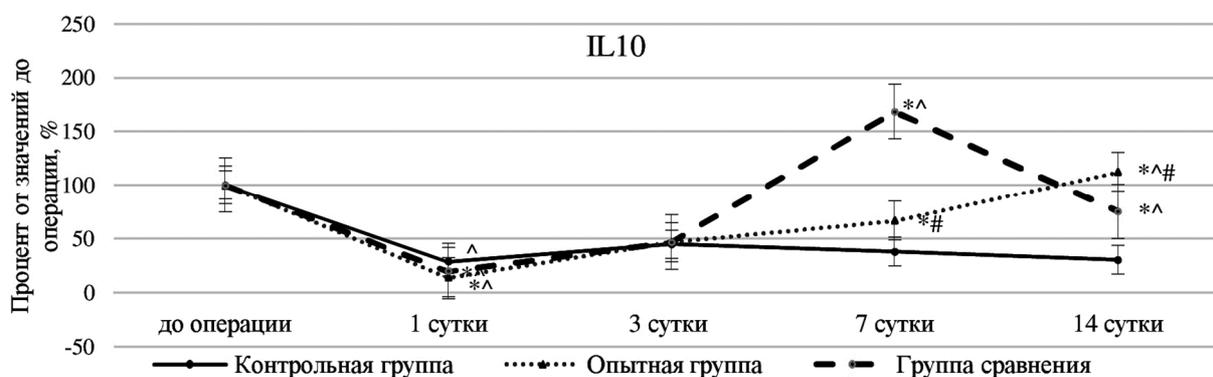


Рисунок 23 – Относительное изменение уровней IL10 при лечении ожоговых ран крыс в динамике (значения до эксперимента принято за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

В группе без лечения не наблюдалось пиков повышения уровня данного цитокина на 7-е сутки в отличие от группы сравнения ($p < 0,05$) и опытной группы ($p < 0,05$), что может быть обусловлено участием противовоспалительных макрофагов на данном этапе заживления ожоговой раны, на которые препараты оказывают положительное влияние. В группе сравнения, так же, как и в опытной, было значительное повышение уровня IL10 на 7-и сутки по сравнению с первым днем лечения. При лечении дермальным гидрогелем наблюдалось сначала снижение

концентрации IL10, затем к 7-м суткам её увеличение и стабилизация на 14-е сутки эксперимента.

Таким образом, внесение экзогенных биологических компонентов ВКМ-коллагена и его гидролизатов, гиалуроновой кислоты и др. оказывают значительное влияние на регуляцию синтеза IL10 и, вероятно, способствуют оптимизации сроков успешной эпителизации и заживления раны.

Динамика изменения содержания факторов роста при экспериментальном лечении ожоговых ран

При проведении сравнительного анализа изменения уровня PDGF было выявлено, что под действием провоспалительных цитокинов его концентрации во всех группах снижались, причём наиболее выраженное снижение на 1-е сутки наблюдалось в контрольной группе (рисунок 24). Начиная с третьих суток после нанесения раны, происходил рост уровня PDGF в группах с экспериментальным лечением, что, по-видимому, обусловлено началом процессов фибринолиза, коллагеногенеза и неоангиогенеза под действием дермального гидрогеля и мази «Левомеколь».

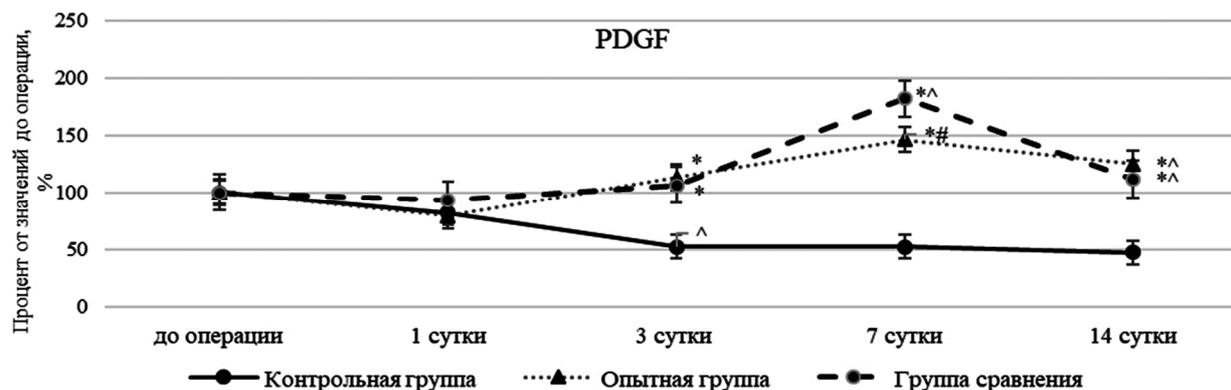


Рисунок 24 – Относительное изменение уровней PDGF при лечении поверхностных ран крыс в динамике (значения до эксперимента принято за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

На 7-е сутки в группе сравнения и в опытной группе уровень данного фактора роста был максимальным на фоне значительного снижения концентрации PDGF в контрольной группе (на 51,95 % по отношению к дооперационному уровню; $p < 0,05$), что может быть обусловлено ранней эпителизацией под действием препаратов, а также отсутствию процессов выраженного гемостаза и неоангиогенеза, характерного для ожоговых ран. На 14-е сутки уровни PDGF соответствовали значениям интактных животных (до операции) – 2219,9 [1869,1; 2362,7] пг/мл против 1774,7 [1358,7; 2417,8] пг/мл в опытной группе, $p > 0,05$; 1719,8 [1632,9; 2108,8] пг/мл против 1559,5 [1428,1; 1964,5] пг/мл в группе сравнения, $p > 0,05$. В контрольной группе значения остались достаточно низкими (меньше на 46,99 % по отношению к дооперационному уровню; $p < 0,05$).

При определении уровня VEGF наблюдался пик его повышения в группе лечения дермальным гидрогелем и мазью «Левомеколь» на 1-е сутки эксперимента в отличие от контрольной группы ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$ соответственно) (рисунок 25). Повышение уровня VEGF ассоциировано с активным ангиогенезом и согла-

суется с динамикой увеличения уровня PDGF на 3-и сутки экспериментального лечения. Кроме того, наблюдалась схожая тенденция в контрольной группе, где не было выявлено периодов активного синтеза VEGF, как и PDGF.

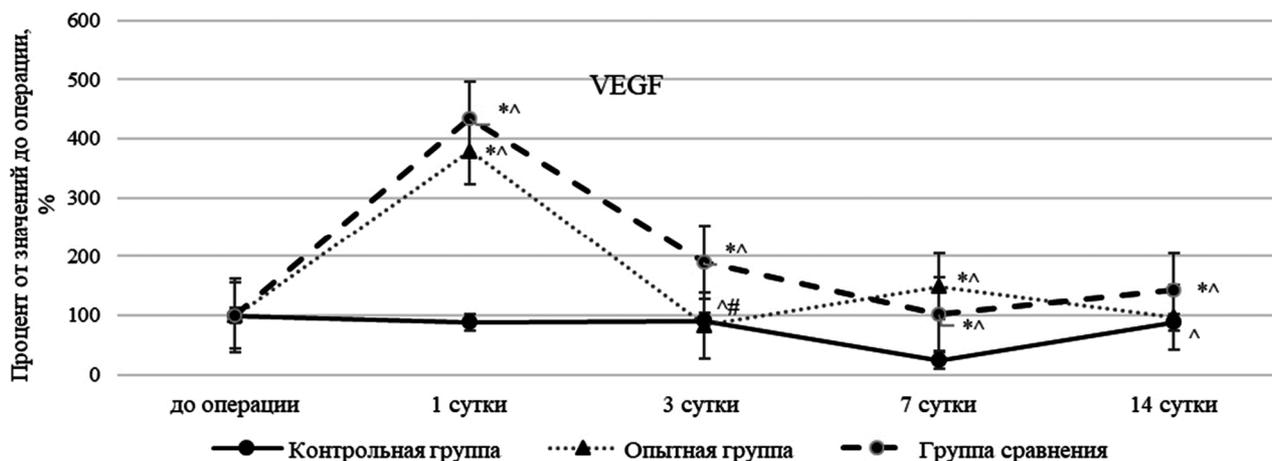


Рисунок 25 – Относительное изменение уровней VEGF при лечении поверхностных ран крыс в динамике (значения до эксперимента принято за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

На 14-е сутки процесс неангиогенеза был завершён, что демонстрировали уровни VEGF, которые в опытной группе не отличались от значений, полученных до начала эксперимента, а в группе были незначительно выше (на 44 %; $p < 0,05$).

Анализ профилей противовоспалительного цитокина TGF β 1 продемонстрировал, что внесение экзогенных биополимеров положительно влияет на процесс репарации (рисунок 26).

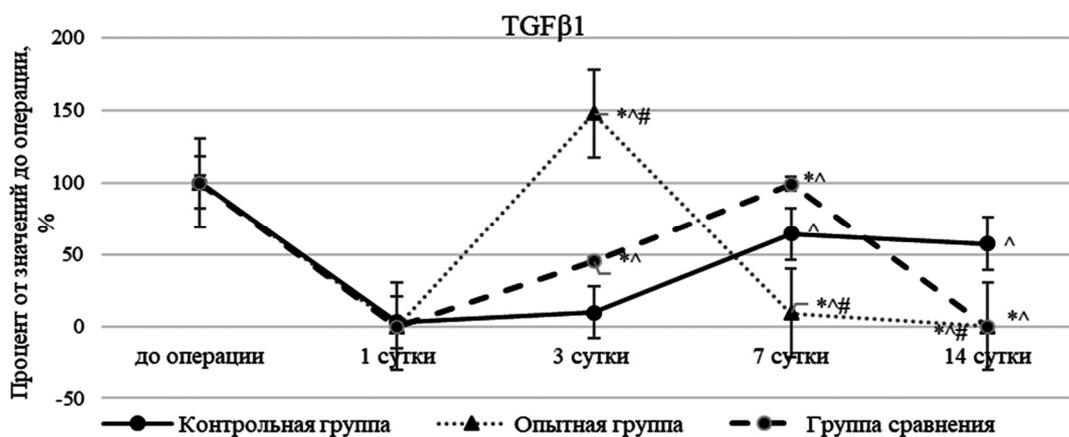


Рисунок 26 – Относительное изменение уровней TGF β 1 при лечении поверхностных ран крыс в динамике (значения до эксперимента принято за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Наблюдалось значительное снижение его уровня на 1-е сутки раневого процесса во всех группах в связи со значительным повреждением и отсутствием процессов коллагеногенеза. Необходимо отметить, что в группе сравнения только на 7-е сутки происходила активация синтеза TGF β 1 по сравнению с

опытной группой, где пик синтеза наблюдался через трое суток экспериментального лечения, однако отличий группы сравнения с контрольной группой не наблюдалось, что может свидетельствовать о положительном влиянии внесения продуктов частичного гидролиза коллагена на процесс заживления раны.

Для демонстрации процессов синтеза и созревания коллагена в области ожоговой раны в ходе репарации был проведён сравнительный анализ изменения содержания уровней IGF1 (рисунок 27).

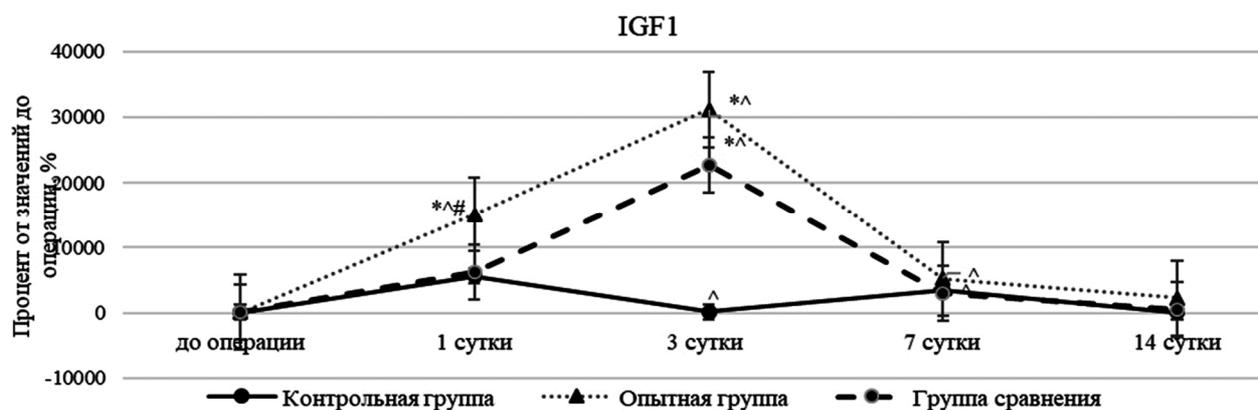


Рисунок 27 – Относительное изменение уровней IGF1 при лечении поверхностных ран крыс в динамике (значения до эксперимента принято за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

В группах с лечением происходил значительный рост его синтеза с 1-х по 3-е сутки, в отличие от группы без лечения. Данная тенденция может отражать потенциальное положительное влияние коллагенов на процессы эпителизации и их негативное влияние на формирование келлоидных рубцов, так как к седьмым суткам в опытной группе стимуляция коллагеногенеза прекратилась, а значения концентрации IGF1 не отличались от состояния до операции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Децеллюляризация может осуществляться по различным технологиям – с помощью различных методов и факторов воздействия. К биологическим методам относится использование ферментов: дезоксирибонуклеаз, эндонуклеаз или трипсина, к химическим – обработка тканей различными химическими агентами: ионными (додецилсульфатом натрия (ДСН)), неионными (тритоном X100) и цвиттер-ионными (CHAPS (сульфонатом 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропана)) детергентами, кислотами (перуксусная кислота) и/или щелочами (гидроксид аммония, сульфид натрия, гидроксид натрия), хелатирующими агентами (ЭДТА), гипотоническими или гипертоническими растворами, спиртами (этанол, метанол) и растворителями. При этом все эти вещества по-разному влияют на ткани – кислоты разрушают нуклеиновые кислоты и солибилизируют компоненты цитоплазмы, спирты дегидратируют клетки и удаляют остаточные нуклеиновые кислоты и липиды, щёлочи денатурируют ДНК, хелатирующие агенты нарушают взаимодействие ВКМ с интегринами, а детергенты – липидно-липидные и липидно-белковые взаимодействия в клеточных мембранах (ионные детергенты могут удалять ГАГ и факторы роста из ВКМ и оставлять в тканях остаточные

ПАВ, поэтому предпочтение отдается неионным детергентам). Тем не менее, не существует единой теоретической основы, позволяющей разработать оптимальную методику децеллюляризации тканей. Поэтому протоколы децеллюляризации варьируют в широком диапазоне в зависимости от типа тканей. Также нет единых критериев качества децеллюляризации. Кроме того, помимо тщательного удаления клеток необходимо учитывать, что различные методы децеллюляризации могут оказывать в той или иной мере нежелательное влияние на ВКМ, получаемый в результате обработки. Например, ферментативная обработка может разрушать компоненты ВКМ; при обработке химическими детергентами возможна денатурация, молекулярная сшивка или селективное удаление некоторых компонентов ВКМ; физические методы децеллюляризации могут повреждать ультраструктуру ВКМ и нарушать его биомеханические свойства. В зависимости от характеристик ткани процесс децеллюляризации может быть модифицирован за счёт варьирования агентов и времени обработки. Чем больше размер ткани, тем больше длительность его обработки. Однако увеличение времени действия детергентов повышает вероятность повреждения компонентов ВКМ. Поэтому для оценки целостности структурной организации ВКМ используют гистологический анализ.

В ходе сравнительной оценки алгоритмов децеллюляризации ксеногенных биологических материалов нами был выбран метод обработки с использованием ферментов и химических детергентов. В частности, модифицированная методика представляла собой следующий алгоритм: 1) замораживание образцов при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 72 часа, затем образец размораживали; 2) обработка раствором трипсин-Версена (в отношении масса образца к массе раствора 1 : 10) при $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6–18 часов; 3) последовательное циклическое воздействие растворами детергентов: 1 % раствора Тритона X-100 в течение 2–3 часов и 4 % раствора дезоксихолата натрия в течение 2–3 часов (количество и продолжительность циклов зависели от конечного применения биопластических материалов); 4) обработка раствором свиной панкреатической ДНКазы I 2000 ЕД в фосфатном буфере с кальцием и при $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 4 часов.

Количественный анализ показал, что содержание ДНК в децеллюляризованной дерме после обработки по разработанной нами методике снижалось в соответствии с требуемыми критериями, гистологический анализ и окрашивание DAPI подтвердили отсутствие ядерного материала и сохранность гистоархитектуры ВКМ дермы. Полученные материалы были протестированы на цитотоксичность и местную токсичность (подкожные имплантации), что позволило выполнить экспериментальное исследование их клинической эффективности при различных патологических процессах.

Полученные нами результаты позволили дать характеристику разработанному биопластическому материалу – АДМ. Децеллюляризованный матрикс обладал биосовместимостью на тканевом уровне, вызывал слабую воспалительную реакцию, при этом не образовывалась соединительнотканная капсула, отграничивающая матрикс от окружающих тканей. Полученные данные продемонстрировали, что толщина вновь сформированной дермы была сопоставима в участках, закрытых исследуемым раневым покрытием (АДМ, засеянный аллогенными дермальными фибробластами) и аутодермопластикой – $19621 \pm 56,3\text{ мкм}$ и $1738 \pm 67,9\text{ мкм}$ соответственно ($p > 0,05$). Результаты проведенного исследования

эффективности применения АДМ, засеянного аллогенными фибробластами свиньи соответствуют литературным данным о том, что клеточная терапия с использованием аллогенных клеток имеет высокую терапевтическую ценность при заживлении ожоговых ран. Первоначально существовала некоторая путаница в отношении того, как проявляются ранозаживляющие эффекты аллогенных клеток. Стало ясно, что аллогенные клетки не прикрепляются и не покрывают рану постоянно, а вскоре замещаются собственными клетками реципиента. В частности, аллогенные клетки способствуют миграции и пролиферации клеток из ложа и краев раны, где они высвобождают факторы роста, компоненты внеклеточного матрикса и базальной мембраны. В конечном счете, роль аллогенных клеток в процессе заживления раны заключается в ускорении эпителизации краев раны и содействии образованию грануляций из раневого ложа.

Схожесть гистологической структуры полученного АДМ со структурой нативной дермы можно объяснить мягким воздействием при детергентно-энзиматической обработке и отсутствием химической сшивки. Это же объясняет и близкие показатели напряжения, относительной деформации при разрыве и начального модуля упругости в АДМ и нативной дерме. Вполне вероятно, что, волокна коллагена в структуре АДМ располагаются упорядоченно и обеспечивают дополнительную прочность при растяжении. Тем не менее, вследствие разрыхления коллагеновых пучков и, тем самым, нарушения их структурированности, значения всех биомеханических характеристик снижались, так как известно, что, пока площадь поперечного сечения волокна будет практически неизменной, предел прочности при растяжении будет постоянным. Полученные нами данные о биомеханических характеристиках дермы соответствуют литературным данным о прочностных характеристиках ткани белой линии живота у человека, при этом значения параметра деформация на разрыв были выше, чем установлено для передней брюшной стенки *ex vivo* (~16 %). Гистологический анализ образцов Permaso1™ показал, что они имели более плотную упаковку коллагеновых волокон, чем в нативной дерме, и меньшую площадь коллагеновых пучков, что делало его менее упругим, однако более устойчивым к применяемым в его отношении биомеханическим тестам, вследствие химической сшивки гексаметилендиизоцианатом. Таким образом, невозможно сделать однозначный вывод о позитивном влиянии использования сшивающего агента при создании дермальных материалов.

Результаты экспериментальной герниопластики методом ненатяжной предбрюшинной герниопластики передней брюшной стенки на свиньях с вентральной грыжей позволили сделать вывод о прочности АДМ, использованного для закрытия грыжевого дефекта, что подтверждается состоятельностью рубца. Кроме того, по данным гистологических исследований не наблюдалось визуальной и морфологической границы между АДМ и апоневрозом, что демонстрирует способность АДМ к полной биоинтеграции. Разработанный биопластический материал продемонстрировал отсутствие адгезии к внутренним органам, образования свищей и сером. В результате гистологического и иммуногистохимического исследования было установлено, что имплантированный АДМ не имел соединительнотканной капсулы в отличие от шовного материала, который провоцировал формирование типичной гранулёмы инородного тела. Вокруг области имплантации материала наблюдалось развитие зрелой соединительной ткани, особенностью которой явля-

лось наличие большого количества коллагеновых и эластических волокон и пролиферирующих фибробластоподобных клеток, при этом отсутствовали признаки воспаления. Гистологические данные границы ткань-имплантат коррелировали с морфологическими показателями прочности в группе с АДМ и с использованием хирургического материала PermacolTM. Однако химически сшитый коммерческий материал продемонстрировал значительно большую жесткость по сравнению с АДМ и брюшной стенкой свиньи через 120 дней после имплантации. В клинической практике это может приводить к усилению болевого синдрома и ощущению инородного материала у пациентов. АДМ продемонстрировал наилучший баланс между биоинтеграцией и ремоделированием соединительной ткани, вызывая при этом минимальную реакцию на инородное тело в отдаленные сроки после имплантации. Сопоставимые результаты были получены при моделировании субпекторального кармана для экспериментального обоснования эффективности медицинской технологии применения АДМ при маммопластике. Для оценки сохранности внеклеточного матрикса было проведено исследование коллагена I типа иммуногистохимическим методом, продемонстрировавшее его достаточно равномерное распределение, что говорит о нормальном формировании соединительной ткани, в частности, оформленного межклеточного вещества. Иммунофенотипирование лейкоцитов не позволило обнаружить экспрессию CD3- и CD68-рецепторов, что коррелировало с авоспалительной гистологической картиной. Экспрессия PECAM-1 (CD31) была положительной в большей части капилляров в поле зрения. Это можно расценивать как отсутствие феномена эндотелиальной дисфункции и адекватную работу микроциркуляторного русла в области имплантации. Необходимо отметить, что сравнительные морфологические результаты образцов тканей полученные в группе сравнения (использование коммерческого хирургического материала PermacolTM) через 60 дней после проведения модельной маммопластики позволили утверждать, что иммуногенность, уровень интеграции в ткани животного и темпы биодеградации у коммерческого препарата PermacolTM и у полученного нами АДМ были сопоставимы. Таким образом, благодаря биологической природе АДМ и отсутствию сшивающих агентов, тканевые и клеточные реакции в области его расположения протекали более физиологично, и наблюдалось постепенное замещение материала вновь образованной соединительной тканью при его использовании в качестве хирургического биопластического материала в экспериментальной реконструктивной хирургии.

По классическим представлениям ВКМ рассматривался как поддерживающая структура для стабилизации расположения клеток в тканях и сохранения архитектуры тканей. Эта концепция резко изменилась за последние несколько десятилетий с открытием того, что протеолитические фрагменты ВКМ оказывают глубокое влияние на структуру, жизнеспособность и функции клеток. Классические примеры взаимодействия ВКМ с клетками включают семейство рецепторов клеточной поверхности интегринов. Однако существуют также взаимодействия, не основанные на интегрине, так как домен лиганда в компоненте ВКМ может становиться биологически активным только после модификации ВКМ. Эти биоактивные домены получили название «матрикриптины», при этом протеолитически высвобожденные фрагменты ВКМ с биологической активностью называются «матрикинами». Считается, что многие свойства биологических матриксов на ос-

нове ВКМ обусловлены небольшими остатками скрытых пептидов в молекулах коллагена, которые вступают в действие после биодеградации или биосорбции исходной молекулы. Протеолитический гидролиз белка ВКМ высвобождает криптопептиды, которые включают ангиогенные, антимикробные, митогенные и хемотаксические свойства. Матрикины и криптопептиды могут быть получены в процессе децеллюляризации ВКМ соединительных тканей и оказывать влияние на клеточную адгезию, форму, миграцию, пролиферацию/выживание и дифференцировку клеток при применении биопластических материалов дермы в лечении ожоговых ран. В проведенном исследовании при использовании дермального гидрогеля при лечении ожоговых ран на 14-е сутки наблюдалось полное восстановление кожи в поражённой области, было зарегистрировано большое количество фибробластов, а эпидермис был заметно утолщён относительно группы без лечения. Это подтверждается и данными других исследователей, например, Fujisaki H. et al. [H. Fujisaki et al., 2008], которые отмечали, что коллагеновые гидрогели, в основном коллаген IV и коллаген I, поддерживают адгезию, пролиферацию и рост фибробластов. Известно, коллаген оказывает положительное влияние на ранние этапы заживления ран, так как способствует агрегации тромбоцитов, стимулирует образование грануляционной ткани на месте раны, поскольку является матрицей для ее образования. В проведенном исследовании была продемонстрирована эффективность использования дермального гидрогеля на основе внеклеточного матрикса дермы свиньи.

Таким образом, биоимплантаты, получаемые из донорского материала животного (свиной ксенографт), представляют собой внеклеточный матрикс – комплекс структурных и функциональных белков, объединенных в уникальную тканеспецифичную архитектуру. Помимо ведущей роли АДМ в поддержании «каркаса» ткани он содержит адгезионные молекулы для регуляции пролиферации клеток. При этом биопластические материалы на основе ВКМ дермы способны индуцировать процесс, называемый «конструктивное ремоделирование» – формирование функциональной ткани соответственно в зоне имплантации. Однако, способность активизировать конструктивное ремоделирование во многом зависит от методов, применяемых для получения ВКМ. Полученные в ходе нашего исследования результаты позволяют утверждать, что детергентно-энзиматическая обработка материала является универсальной, экономически целесообразной и доступной техникой децеллюляризации. Полученные биопластические материалы соответствуют таким характеристикам как биологическая совместимость, стимулирование коллагеногенеза и ангиогенеза, возможность прорасти окружающими тканями, быть гистологически инертными, сохранять мягкость и эластичность и не деформироваться в процессе заживления.

ВЫВОДЫ

1. Разработана оптимальная методика обработки дермы последовательным воздействием растворов детергентов (дезоксихолат натрия, тритон-X100) и ферментов (трипсин, ДНКаз), позволяющая сохранить гистоархитектонику ВКМ плотной соединительной ткани. Коллагеновые пучки АДМ и нативной дермы достоверно не отличались друг от друга по толщине ($12,06 \pm 0,03$ против $12,02 \pm 0,02$ мкм) и упорядоченности; площадь коллагеновых пучков в образцах АДМ была ниже значений нативной дермы ($78,2 \pm 2,4$ против $89,2 \pm 1,9$ %).

2. Комплексная оценка АДМ показала, что остаточная концентрация ГК и сГАГ после детергентно-энзиматической обработки дермы составила – $0,13 \pm 0,06$ и $37,6 \pm 2,1$ мкг/мг ткани соответственно. Разработанный биоматериал не обладает цитотоксичностью и иммуногенностью. Прочность на разрыв составила $9,1 \pm 0,6$ МПа, удлинение при разрыве – $21,1 \pm 2,3$ %, модуль жесткости – $50,0 \pm 1,6$ МПа, что соответствует данным коммерческих аналогов и нативной дермы.

3. Разработан способ моделирования ожоговой раны III и IV степени на крупном лабораторном животном, включающий нанесение ожоговой раны, её иссечение, выполнение аутопластики и/или наложение раневых покрытий, который позволяет оценить эффективность применения различных раневых покрытий как при раннем, так и при этапном хирургическом лечении.

4. Оценка клинико-гистологической картины позволила установить, что использование АДМ в качестве раневого покрытия при ожоговых ранах создает оптимальные условия для регенерации кожи, при этом были определены биохимические особенности динамики восстановления компонентов ВКМ кожи, обусловившие миграцию фибробластов, раннюю эпителизацию и отсутствие келоидных рубцов – высокие уровни виментина, цитокератина и низкие темпы ресинтеза коллагена I типа, отсутствие динамики в уровнях коллагена IV типа и фибронектина.

5. Морфологические особенности биоинтеграции АДМ заключались в формировании в месте имплантации плотной соединительной ткани, содержащей коллаген I типа, фибробластоподобные клетки и эндотелиоциты и в отсутствии воспалительных изменений, что подтверждает целесообразность его использования в качестве фиксирующего материала в реконструктивной пластической хирургии.

6. Разработана оптимальная методика химической обработки дермы 5 % раствором гидроксида натрия, позволяющая получить гидрогелевый материал на основе гидролизованного коллагена внеклеточного матрикса дермы.

7. Оценка биологических характеристик полученного гидрогелевого материала показала отсутствие цитотоксичности, общей и местной токсичности при гетеротопических имплантациях, а также возможность адгезии и пролиферации клеток при инкубации *in vitro*.

8. Определены биохимические особенности динамики восстановления компонентов ВКМ кожи при внесении дермального гидрогеля: ранняя эпителизация, накопление цитокератина на 7-е сутки после нанесения раны было в 2 раза выше ($0,7 [0,4; 1,2]$ против $1,4 [1,3; 1,6]$), чем в контрольной группе, темпы ресинтеза коллагена I типа были ниже, чем в группе животных без лечения; отсутствие влияния на динамику уровней коллагена IV типа и фибронектина.

9. При нанесении дермального гидрогеля в зону альтерации ожоговой раны в сыворотке крови на 1-е сутки был отмечен рост концентраций IL1 β и TNF α , на 3-и и 7-е сутки – IL6, уровни IL8 значимо не изменялись на протяжении всего эксперимента, в отношении противовоспалительных факторов наблюдалась уменьшение концентрации IL10 на 1-е и 7-е сутки, рост количества IL4 на 3-и сутки по сравнению с группой без лечения. С 1-х суток после нанесения раны происходил рост уровней VEGF, с 3-их суток – уровня PDGF в группах с экспериментальным лечением, снижение уровня TGF β 1 на 1-е сутки

раневого процесса во всех группах, а также повышение уровня VEGF и PDGF на 3-и сутки экспериментального лечения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты исследования полученных биопластических материалов могут быть использованы для дальнейшей разработки методологических подходов к замене поврежденных, либо утраченных тканей, а также для научно обоснованного поиска и рационального отбора новых средств для решения проблем трансплантологии. Разработанный ксеногенный АДМ обладает необходимыми физическими характеристиками для использования его в качестве хирургического импланта при лечении грыж передней брюшной стенки.

Методика реконструктивной пластической хирургии молочной железы с помощью АДМ на основе дермы свиньи может быть одной из операций выбора в арсенале реконструктивной хирургии. Преимущество данной методики заключается в ее технической простоте, снижении травматичности вмешательства, уменьшении времени операции, высоком уровне эстетической удовлетворенности.

Дальнейшие исследования применения дермального гидрогеля для регенерации ран позволит создать высокоэффективное ранозаживляющее средство, обладающее значительными преимуществами среди раневых покрытий.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В дальнейшем изучении и экспериментальном исследовании как универсального тканезамещающего материала и скаффолда для тканевой инженерии нуждается биопластический материал – АДМ, так как апробированная в ходе исследования детергентно-энзиматическая обработка дермы позволяет получить тканеспецифичный каркас плотной соединительной ткани. Полученный в ходе диссертационного исследования гидрогелевый материал – дермальный гидрогель можно исследовать как биосовместимый носитель для культивирования клеточных линий различного типа, кроме того, его физические свойства и биохимический состав позволяют развивать дальнейшие исследования в направлении биотехнологии, в частности он может быть основой для включения различных биологически активных веществ и лекарственных препаратов, а также одним их компонентов биочернил для 3D-биопринтинга.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Разработка методики получения дермального внеклеточного матрикса / А.С. Сотниченко, К.И. Мелконян, И.М. Быков [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. – № 4. – С. 81–87. (ВАК, К1)**
2. Морфологический анализ результатов комплексного подхода к лечению ожоговой раны с применением дермальных фибробластов / И.В. Гилевич, А.С. Сотниченко, **К.И. Мелконян** [и др.] // Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14. – № 5. – С. 61–62.

3. Сравнительная характеристика результатов имплантации децеллюляризованных и рецеллюляризованных матриксов кожи свиньи / **К.И. Мелконян**, А.С. Сотниченко, И.М. Быков [и др.] // *Гены и Клетки*. – 2019. – Т. 14. – № 5. – С. 150.
4. Potential use of chitozan-based multilayer wound covering in dental practice / D.I. Ushmarov, S.E. Gumenyuk, **K.I. Melkonyan** [et al.] // *Archiv EuroMedica*. – 2019. – Т. 9. – № 3. – С. 76–80.
5. Разработка новой методики получения дермального внеклеточного матрикса / А.С. Сотниченко, **К.И. Мелконян**, И.М. Быков [и др.] // *Гены и Клетки*. – 2019. – Т. 14. – № 5. – С. 219.
6. **Компоненты внеклеточного матрикса в восстановлении поврежденных тканей: биохимические взаимодействия и протективный эффект** / **К.И. Мелконян**, А.О. Бирюкова, И.М. Быков [и др.] // *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. – 2019. – Т. 9. – № 4. – С. 55–62. (ВАК, К3)
7. **Совершенствование комплексного применения клеточной терапии и биологических раневых покрытий в лечении пациентов с дефектами кожных покровов** / С.Б. Богданов, А.В. Каракулев, **К.И. Мелконян** [и др.] // *Пластическая хирургия и эстетическая медицина*. – 2019. – № 4. – С. 43–49. (ВАК, К1)
8. Sotnichenko, A. Morphological assessment of tissue response to subcutaneous implantation of decellularized hearts and diaphragms / A. Sotnichenko, **K. Melkonyan**, A. Verevkin // *Sciences of Europe*. – 2020. – Vol. 1. – № 61. – P. 24–29.
9. Пат. 2726600 С1 G09В 23/28 А61В 17/00 Способ моделирования кожной раны у свиней в эксперименте / С.Б. Богданов, А.В. Каракулев, В.А. Порханов, И.В. Гилевич, А.С. Сотниченко, **К.И. Мелконян**, Д.И. Ушмаров; заявитель и патентообладатель: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Научно-исследовательский институт – краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского" министерства здравоохранения Краснодарского края (ГБУЗ "НИИ-ККБ № 1 им. проф. Очаповского"), Богданов С.Б., Каракулев А.В., Порханов В.А. Гилевич И.В., Сотниченко А.С., Мелконян К.И., Ушмаров Д.И. – № 20191122965; заявл. 16.07.2019; опубл. от 14.07.2020; Бюл. № 20. – 12 с.
10. Пат. 2717088 С1 А61L 27/36 Способ получения ацеллюлярного дермального матрикса / И.В. Гилевич, А.С. Сотниченко, **К.И. Мелконян**, Я.А. Юцкевич, С.Б. Богданов, А.В. Каракулев, В.А. Порханов; заявитель и патентообладатель: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Научно-исследовательский институт – краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского" министерства здравоохранения Краснодарского края (ГБУЗ "НИИ-ККБ № 1 им. проф. Очаповского"), Гилевич И.В., Сотниченко А.С., Мелконян К.И., Юцкевич Я.А., Богданов С.Б., Каракулев А.В., Порханов В.А. № 2019133278; заявл. 18.10.2019; опубл. от 18.03.2020; Бюл. № 8. – 8 с.
11. Serum cytokine profile during subcutaneous implantation of the decellularized esophagus matrix in rats / **K. Melkonyan**, T. Rusinova, I. Bykov [et al.] // *Journal of Biomaterials Applications*. – 2020. – № 35(3). – P. 446–455. (Scopus, К1)

12. The experience of using «ChitoPran» wound coating for treating a patient with combined injury / S.B. Bogdanov, A.V. Karakulev, K.I. Melkonyan [et al.] // *Traumatology, Orthopaedics and Reconstructive Surgery*. – 2020. – V. 8. – № 3. – P. 327–332. (Scopus, K2)

13. Показатели цитокинового профиля в сыворотке крови крыс при подкожной имплантации децеллюляризованного матрикса пищевода / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, И.М. Быков [и др.] // *Гены и клетки*. – 2020. – Т. 15. – № 4. – С. 46–56.

14. Сравнительная морфологическая характеристика результатов имплантации децеллюляризованных и рецеллюляризованных матриксов кожи свиньи / А.С. Сотниченко, И.М. Быков, К.И. Мелконян [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2020. – Т. 170. – № 9. – С. 377–382.

15. Результаты комплексного подхода к лечению ожоговой раны лица с применением дермальных фибробластов / И.В. Гилевич, С.Б. Богданов, К.И. Мелконян [и др.] // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2020. – Т. 22. – № 5. – С. 138. (ВАК, K1)

16. Морфологическая оценка результатов имплантации децеллюляризованных и рецеллюляризованных дермальных матриксов кожи свиньи / К.И. Мелконян, А.С. Сотниченко, И.В. Гилевич [и др.] // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2020. – Т. 22. – № 5. – С. 147. (ВАК, K1)

17. Хирургические аспекты приживления полнослойного кожного аутотрансплантата на гранулирующую рану / С.Б. Богданов, В.А. Аладьина, К.И. Мелконян [и др.] // *Инновационная медицина Кубани*. – 2020. – № 2 (18). – С. 41–45. (ВАК, K3)

18. Цитокиновый профиль сыворотки крови крыс при подкожной имплантации децеллюляризованного матрикса пищевода / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, Я.А. Юцкевич [и др.] // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2020. – Т. 22. – № 5. – С. 150. (ВАК, K1)

19. Разработка гидрогелевого раневого покрытия на основе дермы свиньи / К.И. Мелконян, Я.А. Козмай, Т.В. Русинова [и др.] // *ФИЗИКО–ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ*. Материалы VIII Международной научной интернет-конференции. – Ставрополь, 2020. – С. 123–127.

20. Оценка гидрогелевого раневого покрытия на основе дермы свиньи / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, А.А. Верёвкин [и др.] // *ФИЗИКО–ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ*. Материалы VIII Международной научной интернет-конференции. – Ставрополь, 2020. – С. 127–130.

21. 10-летний опыт выполнения пластики кожи лица одним полнослойным кожным аутотрансплантатом / С.Б. Богданов, И.В. Гилевич, К.И. Мелконян [и др.] // *Пластическая хирургия и эстетическая медицина*. – 2020. – № 2. – С. 33–39. (ВАК, K1)

22. Comparative analysis of the results of implantation of decellularized and recellularized pig skin matrices / A.S. Sotnichenko, K.I. Melkonian, I.V. Gilevich [et al.] // *eCM Periodical*. – Manchester, 2020. – P. 148.

23. Development of a protocol for the production of dermal extracellular matrix / A.S. Sotnichenko, **K.I. Melkonian**, I.M. Bykov [et al.] // eCM Periodical. – Manchester, 2020. – P. 159.

24. **Перспективы применения многослойных раневых покрытий на основе хитозана в стоматологической практике / А.С. Гуменюк, Д.И. Ушмаров, К.И. Мелконян [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2020. – Т. 27. – № 1. – С. 27–39. (ВАК, К1)**

25. Опыт применения раневого покрытия "Хитопран" при лечении пациента с комбинированной травмой / С.Б. Богданов, А.В. Каракулев, **К.И. Мелконян** [и др.] // Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста. – 2020. – Т. 8. – № 3. – С. 327–332.

26. **Comparative morphological characteristics of the results of implantation of decellularized and recellularized porcine skin scaffolds / A.S. Sotnichenko, I.M. Bykov, K.I. Melkonyan [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2021. – Vol. 170 (3). – P. 378–383. (Scopus, K2)**

27. **Способ моделирования кожной раны у свиней в эксперименте / С.Б. Богданов, А.В. Каракулев, К.И. Мелконян [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2021. – Т. 17. – № 1. – С. 46–50. (ВАК, К2)**

28. **Оценка элиминации ядерного материала при различных методах децеллюляризации дермы / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, Я.А. Козмай [и др.] // Биомедицина. – 2021. – Т. 17. – № S3. – С. 59–63. (ВАК, К1)**

29. **Лечение критического ожога с применением фибробластов (клинический случай) / С.Б. Богданов, А.В. Поляков, К.И. Мелконян [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2021. – Т. 17. – № 2. – С. 195–199. (ВАК, К2)**

30. Исследование местной токсичности гидрогелевого раневого покрытия на основе дермы свиньи / **К.И. Мелконян**, Т.В. Русинова, И.М. Быков [и др.] // VII съезд биохимиков России. X российский симпозиум «Белки и пептиды». VII съезд физиологов СНГ. – Сочи, Дагомыс, 2021. – С. 275–276.

31. Разработка тканезамещающего биопластического материала на основе внеклеточного матрикса дермы / **К.И. Мелконян**, Т.В. Русинова, И.М. Быков [и др.] // VII съезд биохимиков России. X российский симпозиум «Белки и пептиды». VII съезд физиологов СНГ. – Сочи, Дагомыс, 2021. – С. 182.

32. **Результаты закрытия ожоговой раны тканеинженерной конструкцией кожи на основе дермы свиньи / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, А.С. Сотниченко [и др.] // Сборник статей III Всероссийской научно-технической конференции. Состояние и перспективы развития современной науки по направлению «Биотехнические системы и технологии». – Анапа, 2021. – С. 56–63.**

33. **Мелконян, К.И.** Оценка биосовместимости коллагенсодержащего гидрогеля для использования в качестве биочернил для 3D-биопринтинга / **К.И. Мелконян**, А.С. Асякина, М.Л. Золотавина // БИОХИМИЯ XXI ВЕКА. Материалы научно-практической конференции с международным участием. – Краснодар, 2021. – С. 170–174.

34. **Современные методы получения и применения коллагеновых биоматериалов в регенеративной медицине и биотехнологии / К.И. Мелконян,**

Я.А. Козмай, И.М. Быков [и др.] // **БИОХИМИЯ XXI ВЕКА. Материалы научно-практической конференции с международным участием.** – Краснодар, 2021. – С. 175–178.

35. Разработка и комплексная оценка дермального матрикса для реконструктивной пластической хирургии при радикальной мастэктомии / **К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, А.А. Веревкин [и др.]** // Сборник тезисов Краевой отчетной конференции грантодержателей Кубанского научного фонда. – Краснодар, 2021. – С. 183–187.

36. **Сравнительная оценка многофункциональных раневых покрытий на основе хитозана: многоэтапное рандомизированное контролируемое экспериментальное исследование** / **Д.И. Ушмаров, А.С. Гуменюк, К.И. Мелконян [и др.]** // **Кубанский научный медицинский вестник.** – 2021. – Т. 28. – № 3. – С. 78–96. (ВАК, K1)

37. **Total full-thickness skin grafting for treating patients with extensive facial burn injury: A 10-year experience** / **S.B. Bogdanov, I.V. Gilevich, K.I. Melkonyan [et al.]** // **Burns.** – 2021. – Vol. 47. – № 6. – P. 1389–1398. (Scopus, K1)

38. **Сравнительная оценка биомеханических характеристик ацеллюлярного дермального матрикса для герниопластики** / **К.И. Мелконян, К.И. Попандопуло, С.Б. Базлов [и др.]** // **Кубанский научный медицинский вестник.** – 2022. – Т. 29. – № 5. – С. 94–107. (ВАК, K1)

39. **Особенности заживления термической раны в условиях стимуляции неокollaгеногенеза: доклиническое экспериментальное рандомизированное исследование** / **Г.М. Могильная, Е.В. Фомичева, К.И. Мелконян [и др.]** // **Кубанский научный медицинский вестник.** – 2022. – Т. 29. – № 6. – С. 53–66. (ВАК, K1)

40. **Морфологический анализ местной тканевой реакции на подкожную имплантацию фрагментов ацеллюлярного дермального матрикса** / **К.И. Мелконян, А.А. Веревкин, И.М. Быков [и др.]** // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2022. – № 21 (2). – С. 97–104. (ВАК, K1)

41. Пат. 2768156 С1G09В 23/28 А61В 17/00 А61В 17/322 А61L 27/36 Способ подготовки дермы свиньи для создания ацеллюлярного дермального матрикса в эксперименте / **К.И. Мелконян, А.С. Сотниченко, А.А. Веревкин, Т.В. Русинова, А.С. Асякина, Я.А. Козмай; заявитель и патентообладатель: Мелконян К.И., Сотниченко А.С., Веревкин А.А., Русинова Т.В., Асякина А.С., Козмай Я.А. № 2021115743; заявл. 31.05.2021; опубл. 23.03.2022; Бюл. № 19. – 6 с.**

42. **Выбор оптимальной методики для получения различных форм биосовместимых ксенодермальных материалов** / **К.И. Мелконян, Я.А. Козмай, А.А. Веревкин [и др.]** // **Современные технологии в медицине.** – 2022. – Т. 14 (1). – С. 34–43. (Scopus, K2)

43. **Оценка местной токсичности биопластического раневого покрытия на основе дермы свиньи** / **К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, Я.А. Козмай [и др.]** // Сборник тезисов докладов IX Всероссийской научной молодежной школы-конференции. – Москва, 2022. – С. 109.

44. Результаты применения ацеллюлярного дермального матрикса в экспериментальной реконструктивной хирургии / **К.И. Мелконян**, Т.В. Русинова, А.А. Веревкин [и др.] // Сборник материалов Ежегодной отчетной конференции грантодержателей Кубанского научного фонда. – Краснодар, 2022. – С. 293–295.

45. Оценка цитотоксических и морфологических эффектов дермального гидрогеля на дермальные фибробласты / **К.И. Мелконян**, Т.В. Русинова, А.С. Асякина [и др.] // Сборник научных трудов по материалам II Международной научно-практической конференции. – Курск, 2022. – С. 39–41.

46. Патоморфологическая характеристика раневого ложа перед кожной аутопластикой / **С.Б. Богданов**, **К.И. Мелконян**, **А.В. Поляков** [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2022. – Т. 18. – № 1. – С. 73–77. (ВАК, К2)

47. Результаты экспериментальной герниопластики с применением ацеллюлярного дермального матрикса / **К.И. Мелконян**, К.И. Попандопуло, С.Б. Базлов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 174. – № 10. – С. 529–532.

48. Пат. 2791987 С1 А61L 27/60 А61F 2/10 1. Способ децеллюляризации дермы свиньи для реконструктивной пластической хирургии / **К.И. Мелконян**, **А.А. Веревкин**, **Т.В. Русинова**, **А.С. Асякина**, **Я.А. Козмай**; заявитель и патентообладатель: **Мелконян К.И.**, **Веревкин А.А.**, **Русинова Т.В.**, **Асякина А.С.**, **Козмай Я.А.** – № 2022109499; заявл. 08.04.2022; опубл. 15.03.2023; Бюл. № 8. – 9 с.

49. **Мелконян, К.И. Разработка и изучение влияния дермального гидрогеля с экстрактом кукурузы столбиков с рыльцами на процесс репарации скарифицированных ран в эксперименте / К.И. Мелконян, Е.Б. Никифорова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2023. – Т. 67. – № 1. – С. 87–93. (ВАК, К1)**

50. Актуальные вопросы оценки качества поликомпонентного геля репаративного действия / **Е.Б. Никифорова**, **К.И. Мелконян**, **Д.В. Веселова** [и др.] // Медико-фармацевтический журнал Пульс. – 2023. – Т. 25. – № 1. – С. 24–28.

51. Оценка биомеханических свойств материалов на основе дермы для герниопластики / **К.И. Мелконян**, **Т.В. Русинова**, **Я.А. Козмай** [и др.] // Российский журнал биомеханики. – 2023. – № 2. – С. 10–17. (ВАК, К2)

52. **Biomechanical properties of derma materials for hernioplasty / K.I. Melkonyan, T.V. Rusinova, Ya.A. Kozmai [et al.] // Russian Journal of Biomechanics. – 2023. – Vol. 2. – P. 6–11. (Scopus, К3)**

53. Оценка отдаленных результатов имплантации ацеллюлярного дермального матрикса / **А.С. Асякина**, **К.И. Мелконян**, **А.А. Веревкин** [и др.] // Сборник тезисов 26-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». – Пущино : ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023. – С. 76–77.

54. **Разработка и экспериментальное обоснование использования ацеллюлярного дермального матрикса для герниопластики передней брюшной стенки / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, А.С. Асякина [и др.] // Инновационная медицина Кубани. – 2023. – Т. 3. – С. 71–79. (ВАК, К3)**

55. Results of experimental hernioplasty with acellular dermal matrix / K.I. Melkonyan, K.I. Popandopulo, S.B. Bazlov [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2023. – Vol. 174. – P. 514–517. (Scopus, K2)

56. Применение гидрогеля на основе дермы свиньи для экспериментального лечения поверхностных ран / К.И. Мелконян, Я.А. Козмай, Т.В. Русинова [и др.] // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2023. – Т. 22(3). – С. 54–60. (ВАК, K1)

57. Мелконян, К.И. Сравнительная оценка эффективности репарации ожоговых ран при применении гидрогелевого материала на основе дермы: доклиническое экспериментальное исследование / К.И. Мелконян, С.Н. Алексеенко, И.М. Быков // *Кубанский научный медицинский вестник*. – 2023. – Т. 30(6). – С. 15–27. (ВАК, K1)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindol)

IGF – инсулиноподобный фактор роста (insulinlike growth factor)

PDGF – фактор роста тромбоцитов (platelet derived growth factor)

TGF- β – трансформирующий фактора роста β (transforming growth factor β)

TNF α – фактор некроза опухоли α (tumor necrosis factor α)

VEGF – фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor)

АДМ – ацеллюлярный дермальный матрикс

АДМ – ФБ – ацеллюлярный дермальный матрикс – фиксирующий материал

ВКМ – внеклеточный матрикс

ГАГ – гликозаминогликаны

ГК – гиалуроновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КПО – коэффициент площади окрашивания

ММП – матриксная металлопротеиназа

ППС – полная питательная среда

С-ГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны

СД – степень дегрануляции

ТК – тучные клетки

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

Научное издание

Мелконян Карина Игоревна

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Подписано в печать 11.06.2024

Печать трафаретная. Формат 60×84 ¹/₁₆.

Усл. печ. л. 2,0. Тираж 100 экз. Заказ № 2532

Отпечатано в ООО «Издательский Дом – Юг»

350010, г. Краснодар, ул. Зиповская, 9, литер «Г», оф. 41/3,

Тел. +7(918) 41-50-571

e-mail: id.yug2016@gmail.com Сайт: www.id-yug.com